

이학석사 학위논문

염생식물 갯방풍(*Glehnia littoralis*)으로부터  
생리활성성분의 분리 및 구조결정

Isolation and Structure Determination of Bioactive  
Constituents from the Salt Marsh Plant *Glehnia littoralis*

2008년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

엄 영 란



이학석사 학위논문

염생식물 갯방풍(*Glehnia littoralis*)으로부터  
생리활성성분의 분리 및 구조결정

Isolation and Structure Determination of Bioactive  
Constituents from the Salt Marsh Plant *Glehnia littoralis*

지도교수 서 영 완

2008년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

엄 영 란

본 논문을 엄영란의 이학석사 학위논문으로 인준함.

2008년 2월

위원장	이학박사	임 선 영	인
-----	------	-------	---

위 원	이학박사	조 성 환	인
-----	------	-------	---

위 원	이학박사	서 영 완	인
-----	------	-------	---

한국해양대학교 대학원

## 목 차

	Page
List of schemes -----	i
List of tables -----	ii
List of figures -----	iii
Abbreviations -----	viii
List of symbols -----	ix
 Abstract -----	 1
 1 서론 -----	 4
 2 실험 방법 -----	 8
2-1. 재료 -----	8
2-2. 시약 -----	8
(1) 추출, 분획 및 분리 -----	8
(2) 활성 -----	8
2-3. 기기 -----	10
2-4. 추출, 분획 및 분리 -----	11
(1) 추출 및 분획 -----	11
(2) 갯방풍의 활성 성분 분리 -----	12
2-5. 항산화 활성 실험 -----	15
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	15
2-6. 세포수준에서의 활성 실험 -----	18
(1) 세포배양 -----	18
(2) ROS (total free radical 측정) -----	18
(3) MTT 분석에 의한 세포 생존율 측정 -----	20
(4) DAPI 염색을 통한 핵의 관찰 -----	23
(5) 역전사 중합 연쇄 반응 분석 -----	24

3. 결과 및 고찰	25
3-1. 갯방풍에서 분리된 화합물들의 구조결정	25
3-2. <i>in vitro</i> 항산화 활성	74
(1) 갯방풍 용매분획의 활성	74
1) DPPH radical 소거 활성	74
3-3. 세포 수준에서의 활성 효과	76
(1) 갯방풍 용매분획의 활성	76
1) ROS (Total free radical) 소거 활성	76
2) 항암효과	78
① 암세포성장억제효과	78
② DAPI 염색을 통한 핵의 관찰	85
③ mRNA 발현에 미치는 효과	88
(2) 갯방풍에서 분리한 compound 1-9의 활성	89
1) ROS (Total free radical) 소거 활성	89
2) 항암효과	91
① 암세포성장억제효과	91
② mRNA 발현에 미치는 효과	94
4. 요약 및 결론	95
5. 참고문헌	97

## List of schemes

	Page
Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from <i>Glehnia littoralis</i> -----	9
Scheme 2. Isolation of compounds <b>1-3</b> from <i>Glehnia littoralis</i> -----	10
Scheme 3. Isolation of compounds <b>4-8</b> from <i>Glehnia littoralis</i> -----	11
Scheme 4. Isolation of compounds <b>9</b> from <i>Glehnia littoralis</i> -----	12
Scheme 5. Measurement of DPPH radical scavenging effect -----	15
Scheme 6. Procedure of cytotoxicity assay using MTT assay -----	20

## List of tables

	Page
Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR -----	24
Table 2. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectral data for compound <b>1</b> and <b>2</b> -----	32
Table 3. gHMBC spectral data for compound <b>1</b> and <b>2</b> -----	33
Table 4. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectral data for compound <b>3</b> -----	34
Table 5. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectral data for compound <b>4</b> and <b>5</b> -----	35
Table 6. gHMBC spectral data for compound <b>4</b> and <b>5</b> -----	36
Table 7. <sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR and gHMBC spectral data for compound <b>6</b> -----	37
Table 8. <sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR and gHMBC spectral data for compound <b>7</b> -----	38
Table 9. <sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR and gHMBC spectral data for compound <b>8</b> -----	39
Table 10. <sup>1</sup> H NMR, <sup>13</sup> C NMR and gHMBC spectral data for compound <b>9</b> -----	40
Table 11 DPPH radical scavenging effect of the solvent fractions from <i>Glehnia</i> . <i>littoralis</i> (EDA(%)) -----	75



## List of figures

	Page
Fig. 1 Photograph of <i>Glehnia littoralis</i> . -----	7
Fig. 2 Scavenging of the DPPH radical by phenol (Blois, 1958 ). -----	16
Fig. 3 Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system(Crow, 1997). -----	19
Fig. 4 Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells. -----	21
Fig. 5 Chemical structure of compounds <b>1-3</b> from <i>Glehnia littoralis</i> . -----	41
Fig. 6 Chemical structure of compounds <b>4-9</b> from <i>Glehnia littoralis</i> . -----	42
Fig. 7 Chemical partial structure of compound <b>8</b> from <i>Glehnia littoralis</i> . -----	43
Fig. 8 <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	46
Fig. 9 <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	46
Fig. 10 gDQCOSY spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	47
Fig. 11 TOCSY spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	47
Fig. 12 gHMQC spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	48
Fig. 13 gHMBC spectrum of compound <b>1</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	48
Fig. 14 NOESY correlation of key protons for compound <b>1</b> . -----	49
Fig. 15 <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	50
Fig. 16 <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	50
Fig. 17 gDQCOSY spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	51
Fig. 18 TOCSY spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	51
Fig. 19 gHMQC spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	52
Fig. 20 gHMBC spectrum of compound <b>2</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	52
Fig. 21 <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	53
Fig. 22 <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	53
Fig. 23 gDQCOSY spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD.-----	54
Fig. 24 TOCSY spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	54
Fig. 25 gHMQC spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	55
Fig. 26 gHMBC spectrum of compound <b>3</b> in CD <sub>3</sub> OD. -----	55

Fig. 27	$^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>4</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	56
Fig. 28	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>4</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	56
Fig. 29	gDQCOSY spectrum of compound <b>4</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	57
Fig. 30	TOCSY spectrum of compound <b>4</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	57
Fig. 31	gHMQC spectrum of compound <b>4</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	58
Fig. 32	gHMBC spectrum of compound <b>4</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	58
Fig. 33	$^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>5</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	59
Fig. 34	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>5</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	59
Fig. 35	gDQCOSY spectrum of compound <b>5</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	60
Fig. 36	TOCSY spectrum of compound <b>5</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	60
Fig. 37	gHMQC spectrum of compound <b>5</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	61
Fig. 38	gHMBC spectrum of compound <b>5</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	61
Fig. 39	$^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>6</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	62
Fig. 40	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>6</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	62
Fig. 41	gDQCOSY spectrum of compound <b>6</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	63
Fig. 42	TOCSY spectrum of compound <b>6</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	63
Fig. 43	gHMQC spectrum of compound <b>6</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	64
Fig. 44	gHMBC spectrum of compound <b>6</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	64
Fig. 45	$^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>7</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	65
Fig. 46	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>7</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	65
Fig. 47	gDQCOSY spectrum of compound <b>7</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	66
Fig. 48	TOCSY spectrum of compound <b>7</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	66
Fig. 49	gHMQC spectrum of compound <b>7</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	67
Fig. 50	gHMBC spectrum of compound <b>7</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	67
Fig. 51	$^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>8</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	68
Fig. 52	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>8</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	68
Fig. 53	gDQCOSY spectrum of compound <b>8</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	69
Fig. 54	TOCSY spectrum of compound <b>8</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	69
Fig. 55	gHMQC spectrum of compound <b>8</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	70
Fig. 56	gHMBC spectrum of compound <b>8</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	70

Fig. 57	$^1\text{H}$ NMR spectrum of compound <b>9</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	71
Fig. 58	$^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound <b>9</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	71
Fig. 59	gDQCOSY spectrum of compound <b>9</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	72
Fig. 60	TOCSY spectrum of compound <b>9</b> in $\text{CDCl}_3$ . -----	72
Fig. 61	gHMQC spectrum of compound <b>9</b> in $\text{CDCl}_3$ .-----	73
Fig. 62	gHMBC spectrum of compound <b>9</b> in $\text{CDCl}_3$ .-----	73
Fig. 63	Effect of its solvent fractions from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of HT1080 cells. -----	77
Fig. 64	Cellular radical scavenging effect of crude extracts from <i>Glehnia littoralis</i> in HT1080 cells( $2.5\ \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ). -----	77
Fig. 65	Effect of its solvent fractions from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of HT1080 cells. -----	81
Fig. 66	Effect of its solvent fractions from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of U937 cells. -----	82
Fig. 67	Effect of its solvent fractions from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of AGS cells. -----	83
Fig. 68	Effect of its solvent fractions from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of HT-29 cells. -----	84
Fig. 69	Induction of apoptosis by solvent fractions in AGS human gastric carcinoma cells.-----	86
Fig. 70	Induction of apoptosis by solvent fractions in HT-29 human colon adenocarcinoma cells.-----	87
Fig. 71	Inhibition of COX-2 and iNOS by solvent fractions treatment in AGS human gastric carcinoma cells. -----	88
Fig. 72	Inhibition of COX-2 and iNOS by solvent fractions treatment in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. -----	89
Fig. 73	Protective effect of compound 1-9 from <i>Glehnia littoralis</i> on oxidative stress( $10\mu\text{M}$ ). -----	90
Fig. 74	Effect of its compound 1-9 from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of HT1080 cells. -----	92
Fig. 75	Effect of its compound 1-9 from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of U937 cells. -----	92
Fig. 76	Effect of its compound 1-9 from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of AGS cells. -----	93

Fig. 77	Effect of its compound 1-9 from <i>Glehnia littoralis</i> on viability of HT-29 cells. -----	93
Fig. 78	Inhibition of COX-2 by compounds treatment in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. -----	94

## List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
c	: concentration
CD <sub>3</sub> OD	: deuterium methanol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: dichloromethane (methylene chloride)
<sup>13</sup> C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: figure
H <sub>2</sub> O	: water
<sup>1</sup> H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
Hz	: herz (sec <sup>-1</sup> )
IR	: Infrared
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
<i>n</i> -hexane	: normal-hexane
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: superoxide anion radical
·OH	: hydroxyl radical
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO <sub>2</sub>	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
U <sub>max</sub>	: maximal velocity

## List of symbols

$J$	Coupling constant (Hz)
$M^+$	Molecular ion
$m/z$	Mass to charge
$R_f$	Rate of flow
$\delta$	Chemical shift

**Isolation and Structure Determination of Bioactive Constituents from the Salt  
Marsh Plant *Glehnia littoralis***

**Young Ran Um**

***Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime University, Busan,  
606-791, Korea***

**Abstract**

The salt marsh plants live in characteristic environment such as tidal flats and salt marshes. They have a specific mechanism to adapt themselves to these environments and subsequently make specific secondary metabolites different from those of terrestrial plants. Therefore this study was focused on isolation and structure determination of secondary metabolites of the salt marsh plant *Glehnia littoralis* and their bioactivities.

Whole plants of *Glehnia littoralis* were collected by hand in September, 2002, at Pohang in Korea. The collected samples were dried under the shade and extracted twice with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and MeOH, respectively. The combined crude extracts were concentrated *in vacuo* and then partitioned between  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$ . The organic layer was evaporated and re-partitioned between *n*-hexane and 85% aq. MeOH, and

the aqueous layer was also further fractionated into *n*-BuOH and H<sub>2</sub>O.

Antioxidant activity of solvent fractions of *Glehnia littoralis* was evaluated using 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical. *In vitro* scavenging effect of each fraction on DPPH radical increased in the order of *n*-BuOH > 85% aq. MeOH > H<sub>2</sub>O > *n*-hexane fraction. On the other hand, the scavenging effect of each fraction on reactive oxygen species (ROS) generated in HT1080 cells increased in the order of 85% aq. MeOH > *n*-hexane > H<sub>2</sub>O > *n*-BuOH fractions.

Cell growth inhibition effect of each of the solvent fractions was evaluated in HT1080, HT-29, AGS and U937 human cancer cells using MTT assay. The inhibitory effect of solvent fractions was increased in a dose-dependent manner. Among these fractions, 85% aq. MeOH and *n*-hexane fractions showed the potent inhibitory effect on the growth of human cancer cells and decreased the levels of mRNA expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS).

On the basis of the above results, further purification of *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, and *n*-hexane fractions led to the isolation of compounds **1-9**. The chemical structure of these compounds was established by extensive 2D NMR experiments such as <sup>1</sup>H gDQCOSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, and gHMBC and by comparison with published spectral data.

In our measurements for evaluating antioxidant activity of compound **1-9** using *in vitro* DPPH radical and peroxynitrite systems, they exhibited high scavenging activities. In addition, their scavenging activities on the generation of ROS in HT1080 cell system were very high.



Cell growth inhibition effects of compound **1-9** were also evaluated in HT1080, HT-29, AGS and U937 human cancer cells using the MTT assay method. All of them exhibited good inhibitory effects in a dose-dependent manner and decreased the levels of mRNA expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) on the growth of HT-29 human cancer cells.

## 1. 서론

오랜 기간 동안 천연물 화학적 연구는 주로 육상식물에 집중되었으나 육상식물자원이 점점 고갈됨에 따라 천연물화학적 관심의 중심이 해양생물자원으로 이동되고 있으며 최근 웰빙시대 도래에 따른 친환경 자연식품에 폭발적인 수요의 증가는 이러한 자연식품의 원천으로 해양생물자원에 대한 중요성을 한층 배가시키고 있다.

해양에는 육상과는 다른 생태적 특성을 가진 생물이 서식하고 있기 때문에 지금까지 해양생물의 2차 대사산물에 대한 연구는 육상생물이 생산하는 2차 대사산물과는 구조적으로 매우 다른 독특한 생리활성물질이 존재한다는 것을 보여 주었다. 지금까지 해양천연물에 대한 연구는 육상천연물에 비하면 수 십 년에 불과하기 때문에 앞으로 해양천연물의 잠재적 가능성은 매우 클 것으로 사료된다.

해양생물의 서식지 중에 해안은 육상과 해양의 특성이 동시에 나타나며 시·공간적으로 환경의 변화가 심하고 염분을 함유한 토양으로 인하여 식물의 분포가 제한되는 독특한 환경을 나타내는 지역이다. 해안 지역 중에서도 해안염습지 (salt marsh)는 해수의 영향을 주기적으로 받는 곳이라고 정의된 바 있다<sup>1)</sup>.

전 세계적으로 해안 염습지는 온대지방에서 한대지방에 걸쳐 극히 제한적으로 분포하며 우리나라에서는 서남해안 갯벌의 상부지역에 그 군락이 잘 발달되어 있다<sup>2)</sup>. 염생식물은 암염, 바닷가와 같이 토양의 염분 농도가 높아 일반 육상생물이 생육하기 어려운 해안염습지에 자라는 식물이다. 염생식물은 육상으로부터 유입되는 풍부한 유기영양염류와 해양으로부터 유입되는 무기영양염류로 인하여 이러한 환경에 적응한 일부종은 종간 경쟁이 거의 없기 때문에 생산성이 매우 높은 것이 특징이다. 이러한 해안 염생식물의 높은 일차생산량은 온대지

방의 해안염습지에는 초식동물이 거의 없기 때문에 대부분 해안염습지에서 분해되며 분해된 유기물은 저서성 구조류나 플랑크톤의 영양염류로 흡수되어 궁극적으로 염생식물은 해안염습지에서 먹이연쇄의 기초 생산자로서 소비자에게 먹이를 제공하는 중요한 역할을 한다. 우리나라의 해안염습지에 서식하는 식물로는 갯방풍을 비롯하여 함초 (*Salicornia herbacea*), 해홍나물 (*Suaeda maritima*), 칠면초 (*Suaeda japonica*), 갯질경이 (*Limonium tetragonum*) 등, 총 46종이 보고되었다<sup>3)</sup>. 그러나 염생식물이 서식하는 지대는 침식과 퇴적, 바닷물로부터의 직간접적 염의 유입, 불충분한 토양의 수분과 영양성분 그리고 높은 온도로 인하여 토양의 표면이 매우 불안정하기 때문에 일반 육상식물이 자라는데 매우 어려운 환경이다<sup>4)</sup>. 이러한 해안염습지와 같은 독특한 생태계는 전 세계적으로 한정되어 있는 희귀한 곳이며, 이곳에 생육하는 염생식물로부터 육상생태계에서는 볼 수 없는 유용한 신물질이 발견될 확률이 매우 높다고 할 수 있다.

본 연구에 사용된 갯방풍 *Glehnia littoralis* F.Schmidt ex Miq.은 Umbelliferae에 속하는 다년생의 초본으로 우리나라를 비롯해 남태평양 지역의 해안에 주로 분포한다<sup>5)</sup>. 전체에 흰색 털이 나고 뿌리는 모래 속에 깊이 묻히며 높이는 20cm 정도이다. 줄기는 낮고 매우 짧으며 꽃은 흰색으로 6~8월에 피고 잎은 두껍고 윤이 나며 끝이 뭉뚝하다(Fig.1). 바닥에 붙어 자라기 때문에 강한 바람에도 이길 수 있다고 하여 방풍으로 명명 되었으며 해방풍, 빈방풍, 갯방풍으로도 불린다. 갯방풍의 어린 꽃봉오리와 잎은 식용가능하며 뿌리와 근경은 중국에서는 해열제, 진통제, 발한제 등 전통적 의약으로 사용되어져 왔다<sup>6-7)</sup>. 우리나라에서는 예로부터 갯방풍을 막걸리에 담가서 마시면 오래된 중풍을 고칠 수 있다 하였고, 중풍뿐만 아니라 기침, 기관지염, 폐결핵, 요통, 신경통 등에 두루 효험이 있으며 특히 뿌리는 폐를 튼튼하게 하는데 특효가 있다고 전해져왔다<sup>8)</sup>. 앞선 연구에서는 갯방풍으로부터 psoralen, xanthotoxin, bergaten, imperatorin 등의

furocoumarin 계열, coumarin glucoside, polyacetylenic compounds가 분리된 바 있으며 이들 물질은 항종양, 무통증, anti-HIV(human immunodeficiency virus), 항류마티스, 항균, 항진균 등의 여러 가지 효능을 보인 바 있다<sup>9-11)</sup>. 그러나 우리나라 바닷가에 서식하는 갯방풍의 화학성분에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았으므로 본 연구를 통하여 염생식물의 한 종류인 갯방풍이 함유하는 이차대사산물을 분리한 후 생리활성물질을 탐색하여 그 물질의 화학구조를 결정하고 생리활성을 검색하여 유용물질로의 개발 가능성을 탐색하였다.



**Fig. 1** Photograph of *Glehnia littoralis*.

## 2. 실험 방법

### 2-1. 재료

실험에 사용한 갯방풍 (*Glehnia littoralis*)은 2002년 9월 포항에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25 °C에서 보관하였다가 추출하였다.

### 2-2. 시약

#### (1) 추출, 분획 및 분리

Column packing materials은 RP 18 (YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 $\mu$ m)을 사용하였고, TLC plate는 Silica gel 60 F254s (0.5mm, Merck)를 사용하였으며, spray reagent는 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 분사하여 발색되는 것을 관찰하였다. 추출 및 분획, column chromatography, preparative TLC에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 구입하여 사용하였다. HPLC에 사용된 column은 YMC pack ODS-A(250×10 mm, S 5  $\mu$ m, 12 mm)와 guard column (7.5×4.6 mm, Alltech)을 사용하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CDCl<sub>3</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA, deuterium degree 99.8%)와 CD<sub>3</sub>OD (Merck, deuterium degree 99.95%)를 사용하였다.

#### (2) 활성

항산화 활성 실험에 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)은 Sigma에서 구입하였고 RPMI 1640(ST.

Louis, MO, USA), Fetal bovine serum (FBS), 0.05% Trypsin-0.02% EDTA 그리고 100 units/ml Penicillin-Streptomycin은 GIBCO사 (USA)로부터 구입하여 사용하였다. ROS 측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc. (Eugene,OR, USA)로부터 구입하였으며 MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)로부터 구입하여 사용하였다. mRNA 발현에 사용된 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2),  $\beta$ -actin 유전자 및 primer와 전기영동에 사용된 agar, EtBr (ethidium bromide), DAPI 염색에 사용된 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Sigma사에서 구입하여 실험에 사용하였다.

## 2-4. 기기

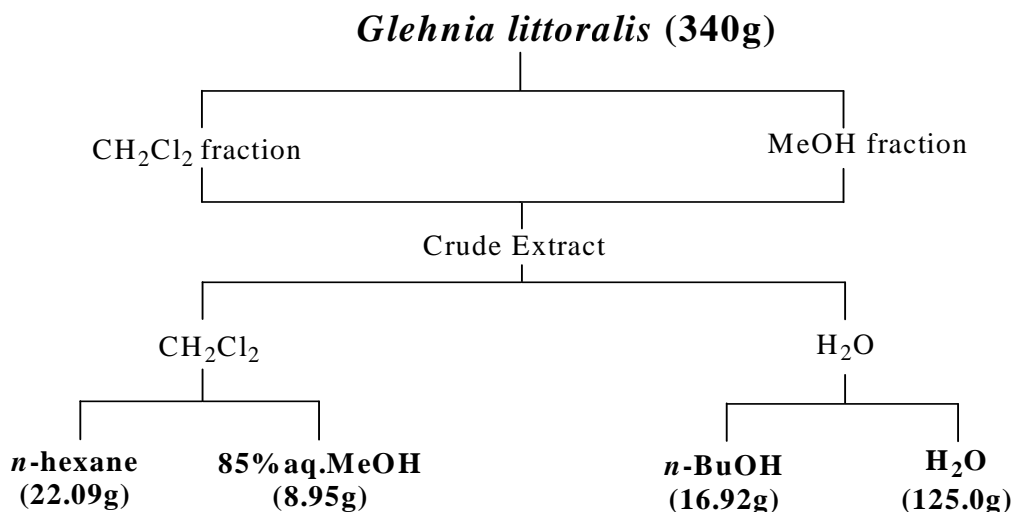
$^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR, two-dimensional NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. 비선광도는 polarimeter(Perkin elmer : U.S.A, 341) 를 사용하여 측정하였다. HPLC는 Dionex p580 pump와 Varian RI detector를 사용하여 화합물을 정제, 분리하였다. UV-Vis spectrophotometer(Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (BioTEK instruments, USA)가 항산화 활성 측정에 사용되었으며 그 외에 rotary evaporator(EYELA, JAPAN), vacuum pump, pH meter, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다. 세포배양은 5%  $\text{CO}_2$  incubator(Forma Scientific, Japan)를 사용하였고 유전자는 PCR(BIORAD, USA)을 사용하여 증폭하였다.



## 2-5. 추출, 분획 및 분리

### (1) 추출 및 분획

채집한 갯방풍 (*Glehnia littoralis*)은 사용하기 전에 -25 °C의 냉동고에 보관하였다가 해빙 후, 잘게 잘랐으며 methylene chloride 용매를 넣고 24시간 방치하여 2번 반복 추출하였다. 얻어진 추출액은 40 °C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator(EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하고 남은 잔사에 동량의 methanol을 부어 위와 동일한 과정을 통해 추출물을 얻었다. 두 추출물을 합한 조추출물은 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여, *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 각각 22.09 g, 8.95 g, 16.92 g, 125.0 g 얻었다 (Scheme 1).

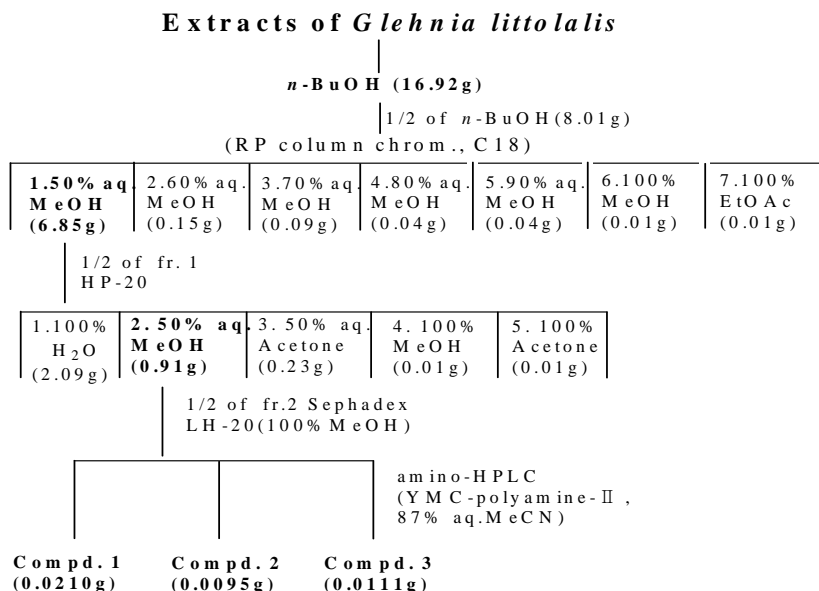


Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from *Glehnia littoralis*

## (2) 갯방풍의 활성 성분 분리

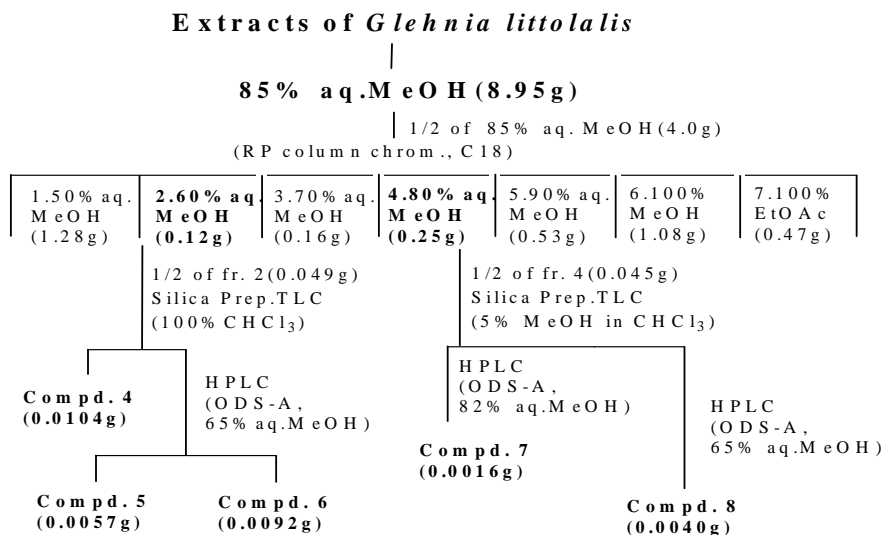
갯방풍의 *n*-BuOH 분획에 대해 MeOH와 물의 혼합용매를 사용하여 RP flash column chromatography를 실시하였으며 50% (rfc 1), 60% (rfc 2), 70% (rfc 3), 80% (rfc 4), 90% aq. MeOH (rfc 5) 과 100% MeOH (rfc 6) 그리고 100% EtOAc (rfc 7)용매 분획을 얻었다.

얻어진 각각의 분획을 <sup>1</sup>H NMR 분광분석 자료와 시료의 양을 고려하여 rfc 1 fraction에 대한 HP20 column chromatography(50% aq. MeOH)를 실시하였다. 여기에서 subfraction 5개를 얻었으며 그 중 subfraction 2를 sephadex LH20 column chromatography (100% MeOH)를 이용하여 subfraction을 64개로 나누었고, subfraction 16, 17, 18은 normal phased HPLC(87% aq. MeCN, amino column)를 이용하여 compound 1, 2, 3을 분리하였다.



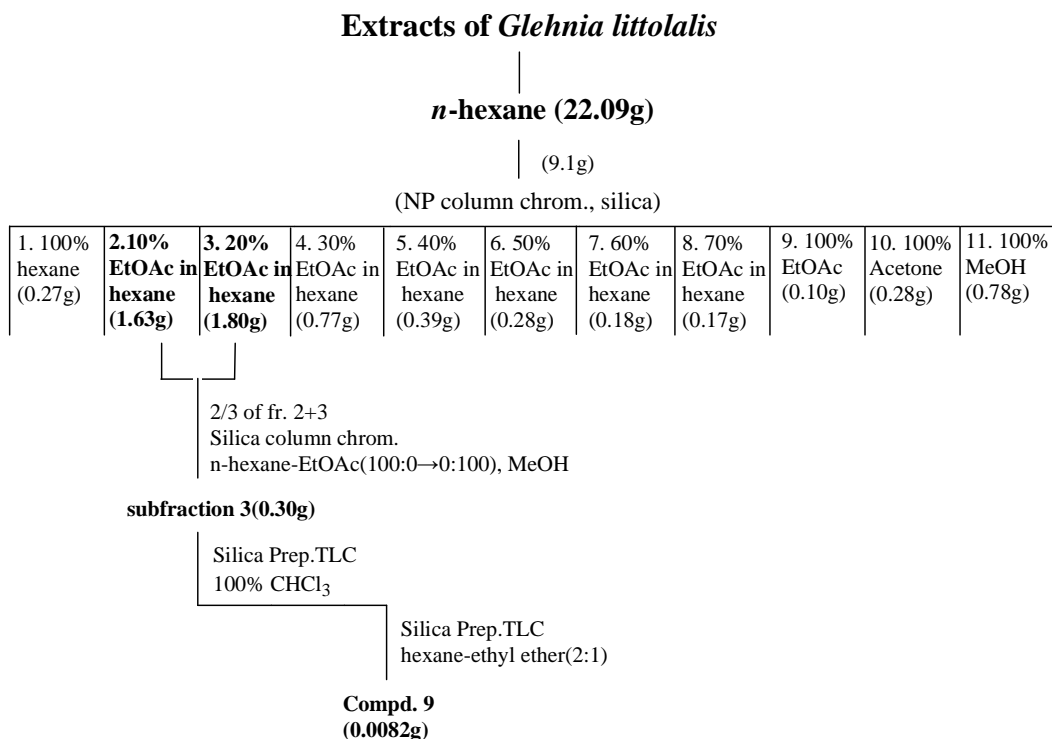
**Scheme 2. Isolation of compounds 1-3 from *Glehnia littoralis***

85% aq. MeOH 분획에 대해서도 MeOH와 물의 혼합용매를 사용하여 RP flash column chromatography를 실시하였으며 50% (rfc 1), 60% (rfc 2), 70% (rfc 3), 80% (rfc 4), 90% aq. MeOH (rfc 5) 과 100% MeOH (rfc 6) 그리고 100% EtOAc (rfc 7)용매 분획을 얻었다. 각각의 분획에 대한  $^1\text{H}$  NMR 분광분석 결과와 시료의 양을 고려하여 rfc 2 fraction을 우선 분석분획으로 선택하였으며 silica gel prep. TLC를 사용하여 100%  $\text{CHCl}_3$  용매로 분리하였다. 총 10개의 subfraction 중 subfraction 1은 순수한 compound 4를 포함하고 있었으며, subfraction 4는 다시 reversed-phased HPLC(YMC ODS-A, 65% aq. MeOH)로 분리하여 compound 5와 6을 얻었다. rfc 4 fraction은 silica prep. TLC (5%MeOH in  $\text{CHCl}_3$ )를 사용하여 모두 14개의 subfraction을 얻었으며 그 중 subfraction 2는 reversed-phased HPLC(YMC ODS-A, 82% aq. MeOH)를 이용하여 compound 7을 분리하였고, subfraction 6과 7에서는 역시 reversed-phased HPLC(YMC ODS-A, 65% aq. MeCN)로 compound 8을 분리하였다.



**Scheme 3. Isolation of compounds 4-8 from *Glehnia littoralis***

*n*-hexane 분획은 silica column chromatography[hexane-EtOAc(100:0→0:100), Acetone, MeOH)를 이용하여 물질분리를 시도하였다. 총 11개의 subfraction 중 subfraction 2, 3을 silica column chromatography [hexane-EtOAc(100:0→0:100), MeOH] , silica prep. TLC [hexane-EtOAc(3:15)] , silica prep. TLC [hexane-ethyl ether(2:1)]를 순차적으로 실시하여 compound 9를 분리하였다.



**Scheme 4. Isolation of compounds 9 from *Glehnia littoralis***

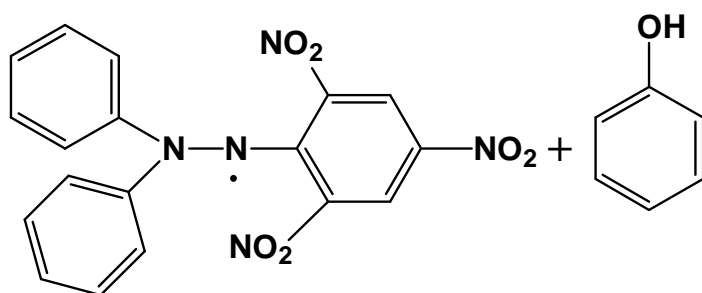
## 2-5. 항산화 활성 실험

### (1) DPPH radical 소거 활성

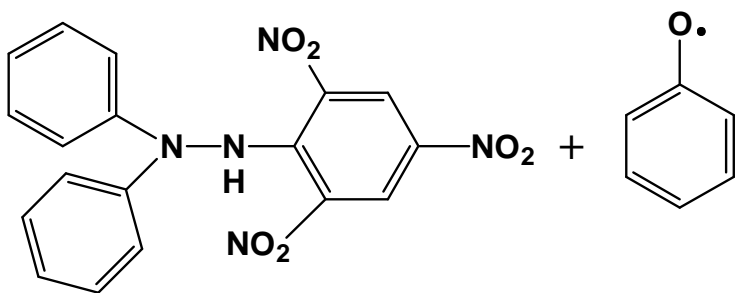
1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 화학적으로 안정한 free radical을 가지는 수용성 물질로써 진한 보라색을 띠며, 518 nm에서 특이적인 흡수 band를 가진다. DPPH에 있는 radical이 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하여 안정한 분자 diphenylpicrylhydrazine이 되면 본연의 보라색을 잃고 노란색을 띠게 되면서, 518nm에서 강하게 보이는 흡수 띠가 사라지게 된다. 반응에 비례하여 색이 변화하고 흡광도도 감소하게 되므로, 실험 시, 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거 활성을 알 수 있다 (Fig. 2). 이런 DPPH 소거 작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색법으로 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성 측정에 많이 사용된다<sup>12)</sup>. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

먼저 각 농도별 시료 (10~200  $\mu\text{g/ml}$ )를 MeOH에 녹여 준비한다. DPPH 시약 2 mg을 정확히 칭량하여 EtOH 15 ml에 녹여 DPPH 원액을 만든다. 원액 1200  $\mu\text{l}$ 에 DMSO 500  $\mu\text{l}$ 와 EtOH을 3000  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 DPPH 희석액을 준비한다. 준비된 DPPH 희석액은 cuvette에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 맞춘다. 준비한 시료를 100  $\mu\text{l}$ 와 DPPH 희석액 900  $\mu\text{l}$ 를 섞은 후 UV 값 518 nm에서 10후에 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내었다 (Scheme 5).

$$\text{EDA (electron donating ability)}(\%) = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$



**DPPH • (Violet, 518nm)**



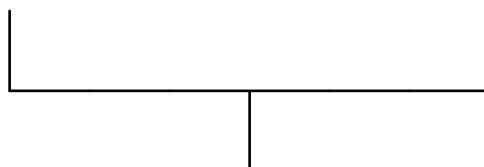
**Diphenylpicrylhydrazine  
(yellow)**

**Phenoxy  
radical**

**Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol .**

**MeOH solution of sample  
at various concentrations**

**Solution of DPPH (2 mg)  
in MeOH (15 mL)**



**Shaking vigorously (10-20 sec)**

**Standing at room temperature for 10 min.**

**O.D. check at 518 nm**

**Scheme 5. Measurement of DPPH radical scavenging effect**

## 2-6. 세포수준에서의 활성 실험

### (1) 세포배양

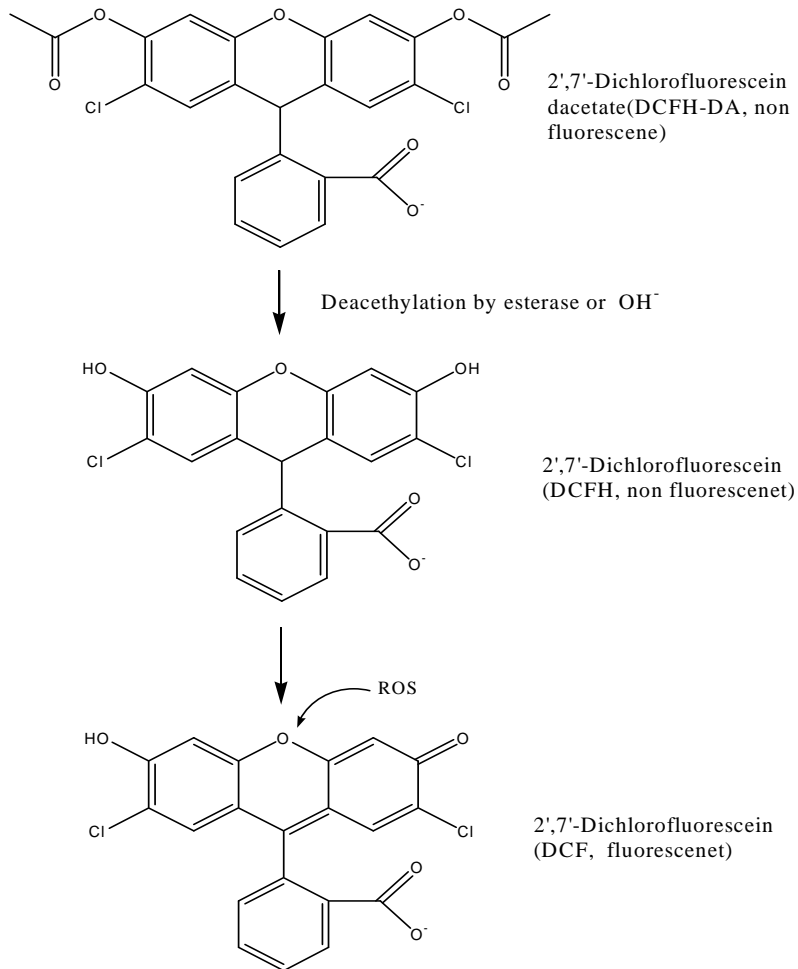
HT 1080 인체 섬유육종 세포 (human fibrosarcoma cells)와 AGS 인체 위암 세포 (AGS human gastric adenocarcinoma cells), HT-29 인체 결장암 세포 (human colon adenocarcinoma cells) 및 U937 (human histocytic lymphoma cells)은 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. 이들 세포는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM와 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일 주일에 2-3회 refeeding하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% Trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 ml cell culture flask에 10 ml씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6-7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### (2) ROS(total free radical 측정)

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다<sup>13)</sup>. DCFH-DA (fluorescence probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Sigma)는 세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발 생하는 형광을 측정함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다. 세포 를 96 well에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS(phosphate buffered saline) 완충액 으로 씻은 후 20 µM DCFH-DA을 각 well에 주입하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에 서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 incubation 한 후, DCFH-DA을 없애고 PBS 완충액으로



씻은 세포에 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 ex. 485 nm, em. 530 nm에서 형광 분석기로 측정하였다 (Fig. 3).



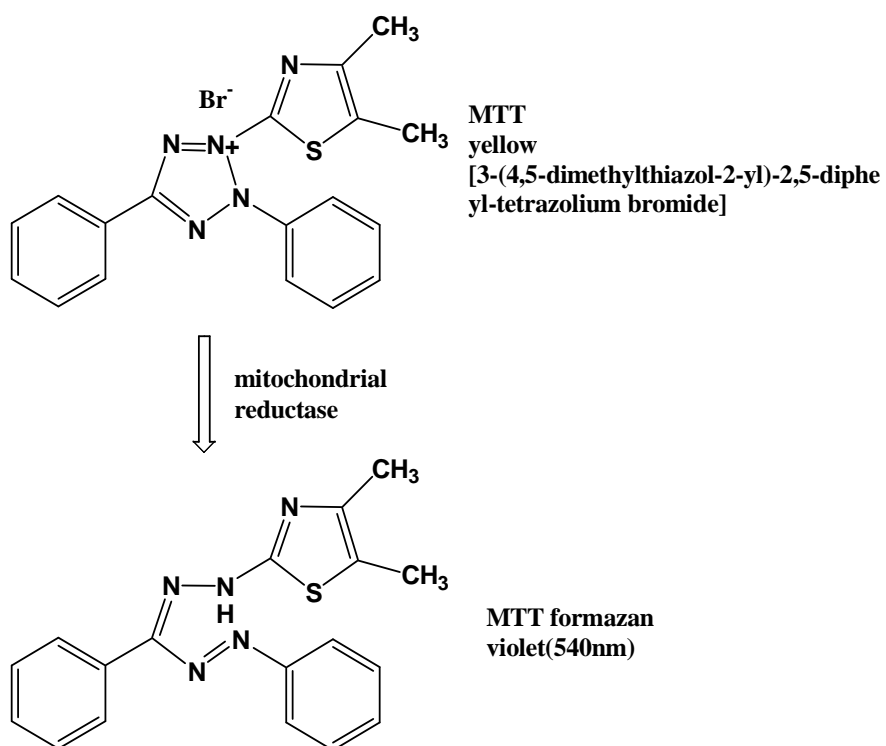
**Fig. 3. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system (Crow, 1997).**

### (3) MTT 분석에 의한 세포 생존율 측정

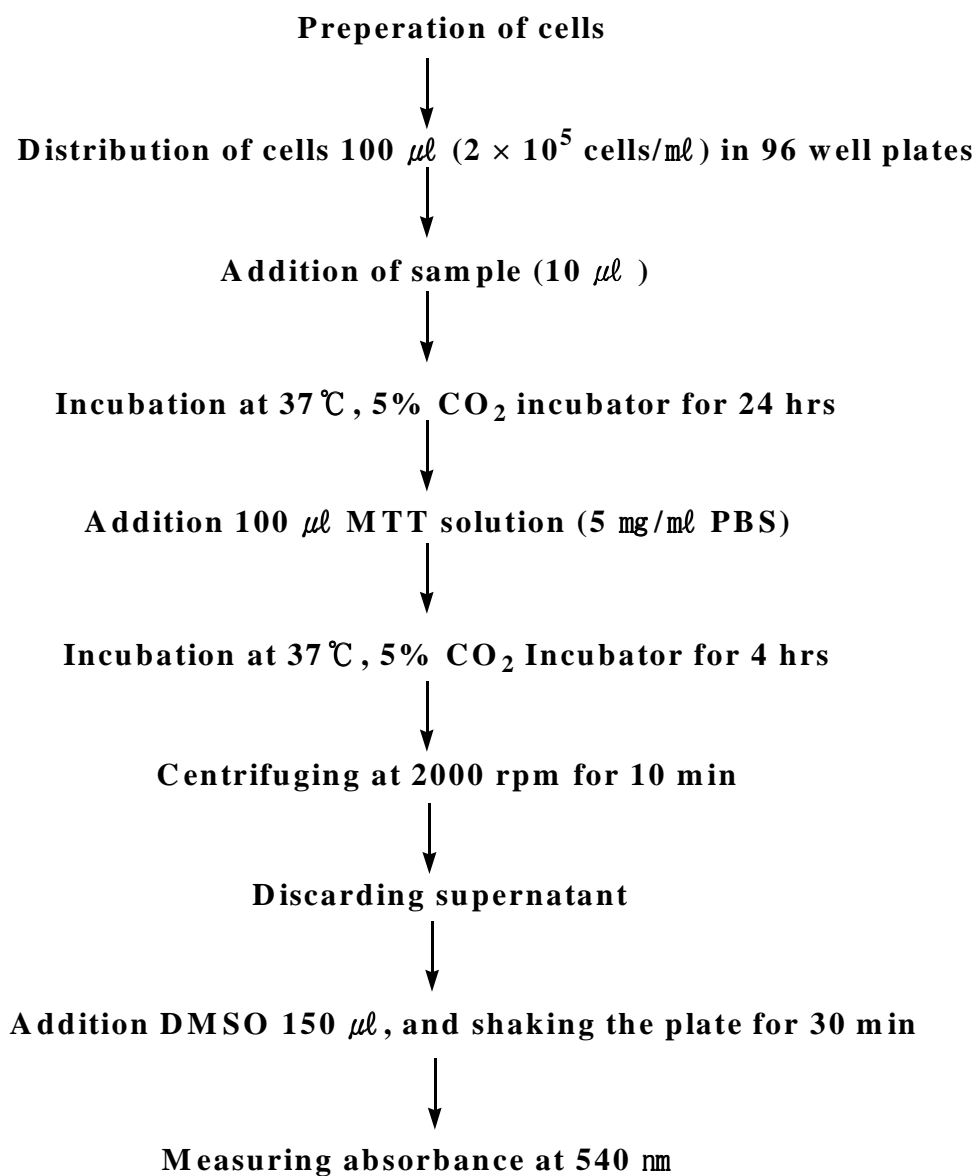
MTT assay를 이용하여 갯방풍이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. MTT assay는 세포의 증식과 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로써 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사 과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색인 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] crystal로 환원시킨다. 생성된 MTT formazan의 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

배양된 암세포를 96 well micro-plate에 well 당  $2 \times 10^5$  cells/ml로 100  $\mu$ l씩 분주하여 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 배지 90  $\mu$ l 와 일정농도의 시료 10  $\mu$ l를 첨가하여 37°C, CO<sub>2</sub> incubator 에서 48시간 배양하였다. 대조군에는 시료 대신 PBS 10  $\mu$ l를 첨가하였다. 48시간 배양 후 MTT 시약(0.5 mg/ml)를 각 well에 100  $\mu$ l씩 처리하고 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 3~4시간 동안 incubation하여 formazan형성을 관찰한다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 DMSO 100  $\mu$ l를 넣어서 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 아래의 식을 이용하여 억제율(%)을 구하였다 (Fig. 4).

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$



**Fig. 4. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.**



**Scheme 6. Procedure for measurement of cytotoxicity using MTT assay**

#### **(4) DAPI 염색을 통한 핵의 관찰**

시료의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를 DAPI염색법으로 핵의 형태변화의 관찰을 통해 확인하였다. 시료를 처리한 세포들을 PBS로 수세하고 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 fluorescence microscope (Olympus BX50, Japan)을 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다.

**(5) 역전사 중합 연쇄 반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석**

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNazol B (GIBCO, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer (GIBCO, USA)와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2  $\mu$ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 iNOS와 COX-2 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다 (Table 1).

이때 housekeeping 유전자인  $\beta$ -actin 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

**Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR**

Gene name		Sequence
iNOS	Sence	5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
	Antisence	5'-CAC-AGA-ACT-GAG-GGT-ACA-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-ATT-GCT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
$\beta$ -actin	Sence	5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3'
	Antisence	5'-TCC CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA-3'

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 갯방풍에서 분리된 화합물들의 구조결정

Compound 1은 무색의 gum 형태로 분리되었으며 분자식은 질량분석과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 데이터 분석에 의하여  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_{16}$ 으로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  7.42-7.21에서 나타난 신호와  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  139-128에서 나타난 신호는 하나의 aromatic ring이 존재함을 보여 주었다. 또한  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 보여진 6개의 신호들( $\delta$  78.0, 77.9, 75.0, 71.7, 71.6, 62.7)은 oxygenated carbon들이 존재함을 보여 주었으며  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼의  $\delta$  3.89-3.22 영역에 나타난 여러 개의 대응하는 신호들도 이러한 해석을 지지하였다. 이러한 분석과 더불어  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서 sugar의 전형적인 anomeric proton( $\delta$  4.35, 1H, d,  $J = 11.8$  Hz)과 대응하는  $^{13}\text{C}$  스펙트럼의 탄소신호( $\delta$  103.1)는 하나의 sugar 고리가 존재함을 분명하게 나타내었다. 하나의 sugar moiety와 aromatic ring이 존재함은 분자식을 통한 불포화도 값( $U=5$ )과도 정확히 일치하였다. 방향족 화합물의 탄소 영역에서 나타난 4개의 peak는 단일 치환된 benzene ring에서 -ortho와 -meta 위치의 carbon이 동등한 자기적 환경에 의해서 같은 공명 peak를 가지기 때문인 것으로 확인되었다. 이는 -ortho와 -meta위치의 탄소 peak의 세기가 다른 방향족 탄소 신호들보다 강하게 나타났으며, 뿐만 아니라 그에 대응한 수소 신호들의 갈라짐 형태에 의해서도 위의 해석이 뒷받침되었다.

Compound 1의 전체적인 구조는  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, gHMBC와 같은 2D NMR 실험을 이용하여 결정하였다.  $\delta$  4.65와 4.92의 수소 신호는 gHMBC 실험에 의해 방향족 고리의 quaternary carbon인 C-1 ( $\delta$  138.9)과 sugar ring의 anomeric carbon인 C-1'( $\delta$  103.1)에 연결된 O-methylene(C-7)임을 알

수 있었다. 그러므로 방향족 고리와 sugar 고리는 C-7 탄소를 통하여 서로 연결되었다는 것이 분명하게 확인되었다. 또한 sugar에 존재하는 수소의 배향은 H-1', H-3' 그리고 H-5'사이의 상호 NOESY correlation을 통하여 axial로 밝혀져 sugar가 D-glucopyranoside임을 보여 주었다(Fig. 13). 이와 같이 compound 1의 정확한 구조는 benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside로 결정되었으며 이는 이미 이전에 알려진 화합물으로써 문헌치의 NMR data와 비교 분석한 결과 잘 일치하였다<sup>15-16</sup>).

Compound 2는 역시 무색의 gum의 형태로 분리되었으며 질량 분석과 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼 분석을 통해 이 화합물의 분자식은 C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>으로 결정하였다. Compound 2는 compound 1과 거의 유사한 NMR 스펙트럼의 형태를 나타내었다. 차이점으로는 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼의  $\delta$  65.5-80.5 부근인 sugar 영역에서 compound 1보다 4개 더 많은 탄소신호가 보여 졌다. 동시에  $\delta$  110.9에서 anomeric carbon으로 보이는 탄소신호가 1개 추가된 것으로 보아 compound 1에 sugar 형태의 5-membered ring이 하나 더 포함되어 있음이 추측되었다. <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서도 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼의 anomeric carbon에 대응하는 신호가  $\delta$  5.04 (d,  $J = 2.5$  Hz, H-1'')에서 나타났으며,  $\delta$  3.98-3.58 영역에서 전형적인 oxygenated proton들의 신호가 나타나 또 다른 고리의 존재를 나타내었다. 추가된 5-membered ring의 정확한 구조는 <sup>1</sup>H COSY, TOCSY, gHMQC, gHMBC 실험을 바탕으로 apiose임을 알 수 있었다. Compound 2의 6-membered ring의 구조 역시 NOESY correlation을 통하여 D-glucopyranoside임이 확인되었고, apiose의 stereochemistry는 NOESY 실험에서 H-1''( $\delta$  5.04)과 H-4''( $\delta$  3.98), H-4''( $\delta$  3.77)과 H-5''( $\delta$  3.58) 그리고 H-2''( $\delta$  3.93)과 H-5''( $\delta$  3.58)의 correlation을 관찰함으로써 D-apiose임을 알 수 있었다. 이와 같이 이 화합물의 구조는 O- $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1'' $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-glucopyranoside로 결정되었으며 문헌조사 결과 이미 알려진 화합물로 확인되었다. Compound 2의 NMR 스펙트럼 데이터를



비롯한 여러 가지 분광학적 자료는 보고 된 것과 잘 일치하였다<sup>17)</sup>.

유사한 대사물질 compound 3 역시 질량 분석과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 분석에 의해 분자식이  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_9$ 로 확인되었다. Compound 3은 compound 1과 달리  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 3개의 methine peak( $\delta$  112.9, 115.8, 121.5)와 3개의 quaternary carbon( $\delta$  133.3, 148.5, 146.0)이 나타났으며, 이와 관련하여  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서도  $\delta$  6.87(s),  $\delta$  6.70(m)에 신호를 보임으로써 compound 1과는 다른 형태로 치환된 방향족 고리가 존재함을 예상할 수 있었다. 그리고  $\delta$  62.7-77.9 영역의 oxygenated carbons 및  $\delta$  3.18-4.29 영역의 oxygenated protons의 신호는 compound 1과 유사하게 1개의 sugar를 포함하고 있음을 보여 주었다. 이들 고리 구조의 확인은 추가적인 2D NMR 실험을 통하여 결정되었고 그 결과, 1,3,4-trisubstituted aromatic ring과 D-glucopyranoside임을 확인하였다. 이들 고리 구조 이외에  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서 나타난  $\delta$  2.99(m, H-7),  $\delta$  4.11(dd,  $J$  = 9.8, 5.6 Hz, H-8),  $\delta$  3.90-3.71(m, H-8, H-9)의 신호는  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY 실험을 통해서 propane chain moiety임을 확인하였고,  $\delta$  4.11(H-8)의 O-methylene proton이  $\delta$  49.7(C-7) 그리고  $\delta$  64.9(C-9)와 각각 gHMBC 실험에서 correlation을 보임으로써 이 사실을 지지하였다. 또한  $\delta$  2.99(H-7)의 peak는 gHMBC 실험에서 propane chain moiety 뿐만 아니라 aromatic ring의 C-1, C-2, C-6과 long-ranged correlation을 보임으로써 propane chain part가 aromatic ring의 quaternary carbon C-1에 연결되어 있음이 증명되었다. 또  $\delta$  3.84(H-10)의 methoxy proton은 gHMBC 실험에서 aromatic ring의 quaternary carbon인 C-3과의 연결이 확인되었다. 이와 같이 compound 3의 구조는 1- $\beta$ -D-glucosyloxy-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-propane-1,3-diol로 결정되었다. 문헌조사 결과 이 화합물은 알려진 물질로써 분광학적 데이터는 문헌치와 잘 일치하였다<sup>18)</sup>.

Compound 4는 연노란색의 결정형태로 분리되었으며 EI-MS 스펙트럼과  $^{13}\text{C}$  NMR

스펙트럼에 의해  $C_{12}H_8O_4$ 로 결정되었다.  $^1H$  NMR 스펙트럼에서  $\delta$  6.25(d,  $J = 9.6$  Hz, H-3),  $\delta$  8.13(d,  $J = 9.6$  Hz, H-4),  $\delta$  7.57(d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'),  $\delta$  7.00(d,  $J = 2.0$  Hz, H-3')에서 4개의 특징적인 downfield protons의 신호가 관찰 되었고 짝 지음 상수값과  $^1H$  COSY 실험을 통해 C-3( $\delta$  112.5) 과 C-4( $\delta$  139.1), C-2'( $\delta$  144.7)와 C-3'( $\delta$  105.0)가 각각 연결되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한  $\delta$  158.2-106.3의 영역에서 나타나는 5개의 quaternary carbon의 존재를 통하여 다수의 이중결합이 존재함을 추측할 수 있었으며,  $\delta$  161.1 (C-2)의 영역에서 나타난  $^{13}C$  NMR 스펙트럼 신호로 carbonyl carbon의 존재를 예상하였다. 전체적인 화합물의 구조를  $^1H$  COSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, gHMBC와 같은 2D NMR 실험을 통해 확인하였다. 특히  $\delta$  7.11(s, H-8)에 나타나는 singlet의 수소 신호는 gHMBC 실험을 통해서 C-7( $\delta$  158.2)과 C-9( $\delta$  152.6)에 연결을 보였고, 이를 포함한 2D NMR 스펙트럼 분석 결과, compound 4는 전형적인 furocoumarin 골격을 가진 화합물임을 확인할 수 있었다.  $\delta$  4.26(s, O-CH<sub>3</sub>)에 나타난 methoxy group은 gHMBC 실험을 통해 aromatic carbon인 C-5( $\delta$  149.4)에 연결되어 있음을 알 수 있었다. 문헌에 보고된 NMR 분광 데이터와 비교를 통하여 본 화합물을 5-methoxypsoralen(Bergapten)으로 결정하였다 (Elgmal *et al.*, 1979).

Compound 5는 무색의 침상결정으로 얻어졌으며 EI-MS 스펙트럼과  $^{13}C$  NMR에 의해서  $C_{13}H_{10}O_5$ 로 확인되었다. Compound 5는 compound 4와 매우 유사한 NMR 스펙트럼을 나타내었으나 뚜렷한 차이점으로는 compound 4의  $\delta$  7.11(s, H-8)에서 나타났던 methine proton peak가 사라지고,  $\delta$  4.15(s, O-CH<sub>3</sub>)에서 새로운 1개의 methoxy group의 신호가 관찰되었다.  $^{13}C$  NMR 스펙트럼에서도 compound 4와 달리 1개의 methine carbon 신호가 사라지고  $\delta$  61.7에서 1개의 methoxy carbon의 신호가 추가로 관측되었다. 이 신호는 gHMBC 실험을 통하여 C-8에 연결되어 있음을 확인하였다. 문헌조사를 통해 compound 5 역시 이미 알

려진 화합물인 5,8-dimethoxypsoralen(Isopinpinellin)으로 밝혀졌으며, 보고 된 분광 데이터와 정확히 일치하였다<sup>19)</sup>.

Compound 6 역시 무색의 침상결정으로 분리되었으며 EI-MS 질량 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼 분석에 의해서 분자식은 C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>로 확인되었다. 이 화합물을 compound 4와 비교한 결과, 분자식을 비롯하여 수소 및 탄소 NMR 스펙트럼이 거의 유사하였다. 하지만 compound 4의 δ 7.57(d, *J* = 2.0 Hz, H-2') 그리고 δ 7.00(d, *J* = 2.0 Hz, H-3')의 수소 신호가 각각 δ 7.67(d, *J* = 2.0 Hz)의 저자장과 δ 6.80(d, *J* = 2.0 Hz)의 고자장으로 이동한 것이 관측되었다. 이러한 변화는 compound 4의 C-5(149.4)에 연결되었던 methoxy group을 C-8으로 이동시킴으로써 설명이 가능하였으며 gHMBC 실험 또한 이 사실을 지지하였다. 모든 NMR 분광학적 데이터를 종합하여 이 화합물의 구조는 8-methoxypsoralen(Xanthotoxin)로 결정하였으며, 이는 이미 보고된 화합물로 문헌조사를 통해 분광학적 데이터 값이 동일함을 확인하였다<sup>6)</sup>.

Compound 7은 무색의 침상결정이며 EI-MS 질량분석과 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼 분석에 의해서 C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>로 확인되었다. 이 화합물의 NMR 스펙트럼은 compound 6과 대단히 유사한 형태를 보였다. Aromatic ring에 기인한 영역의 신호는 거의 동일하였으나 <sup>1</sup>H NMR spectrum에서 compound 6의 δ 4.29에 존재하던 methoxy proton 신호가 사라지고 4개의 새로운 신호(δ 4.99, 2H, d, *J* = 7.2 Hz; δ 5.65, 1H, t, *J* = 7.2 Hz; δ 1.73, 3H, s; δ 1.71, 3H, s)가 나타났다. 이들 부분구조는 <sup>1</sup>H COSY 실험을 통해 H-1" 신호와 H-2"가 연결되어 있음이 확인되었고, gHMBC에서 2개의 methyl peak(δ 1.73, 1.71)가 quaternary carbon인 C-3"(δ 139.7) 그리고 C-2"(δ 119.6)과 correlation을 보임으로써 3-(2-methyl-2-butenoxy) group으로 확실히 결정되었다. 이 부분구조와 aromatic ring과의 연결은 gHMBC 실험에서 H-1"(δ 4.99)가 C-8(δ 131.5)과 correlation을 보임으로써 C-8에 연결되어 있음

이 확인되었다. 이는 알려진 화합물인 imperatorin으로 밝혀졌으며 보고된 분광학적 데이터 값이 잘 일치하였다<sup>6)</sup>.

Compound 8은 노란색을 띠는 oil의 형태로 분리 되었으며, 이 물질의 분자식은 EI-MS 질량분석과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼 데이터에 의해서  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2$ 로 확인되었다.  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼의 downfield 영역에서 olefinic carbon들로 예상되는 4개의 신호( $\delta$  135.7, 134.6, 127.6, 117.3)가 관찰되었다.  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼에서도 이에 상응하는 수소 신호들이  $\delta$  5.90-5.40의 영역에서 나타났다. 또한 DEPT 실험을 통하여 이 이중결합 탄소들중에 화합물의 말단에 존재하는 methylene carbon이 존재함이 확인되었다. 이 뿐만 아니라  $^{13}\text{C}$  NMR과 DEPT 실험을 통하여 4개의 quaternary carbon( $\delta$  79.8, 78.2, 70.3, 63.5), 2개의 oxymethine carbon( $\delta$  63.5, 58.6), 6개의 methylene carbon( $\delta$  31.9, 29.4, 29.3, 29.2, 27.8, 22.7), 1개의 methyl carbon( $\delta$  14.2) 신호가 관찰되었다. 두 개의 이중결합을 제외한 나머지 불포화도 값( $U=4$ )과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼의 chemical shift를 고려할 때 4개의 quaternary carbon이 2개의 삼중결합으로 존재함을 예상할 수 있었고, 이는  $V_{\max}=2200\text{ cm}^{-1}$  영역에서 강하게 나타난 IR spectrum 흡수띠를 통하여 입증되었다. 위의 정보와 함께  $^1\text{H}$  COSY와 TOCSY 실험을 통해 Fig. 7과 같은 부분구조를 제시할 수 있었다.

부분구조 a와 b, c와 d의 연결은 부분구조 a와 b에 존재하는 hydroxymethine proton과 인접한 탄소들과의 long-ranged correlation을 통해서 연결할 수 있었다. 하지만 부분구조 b와 c의 연결은 분자식과 탄소들의 chemical shift값을 고려할 때 이러한 연결방법외에는 다른 경우의 수가 존재하지 않았다. 이와 같이 compound 8의 구조는 heptadeca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol로 결정되었으며 문헌 조사 결과 이 화합물은 이전에 분리된 화합물인 falcarindiol임이 확인되었다<sup>20)</sup>.

Compound 9는 노란색을 띠는 oil의 형태로 분리 되었으며, 분자량 결정은

HREI-MS 분석과  $^{13}\text{C}$  NMR에 의해서  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_2$ 로 확인되었다. Compound 9는 앞서 분리된 compound 8과 유사한 형태를 보이거나 분자량과  $^{13}\text{C}$  NMR 데이터 스펙트럼을 통해서 관찰된 중대한 변화는  $\delta$  58.6의 oxymethine 신호가 사라지고 관련된 신호로써  $\delta$  3.01의 영역에서 뚜렷한 doublet 수소 신호가 나타났으며, 이 신호는  $^1\text{H}$  COSY 실험에서  $\delta$  5.37 (m, H-9)과 강한 correlation을 보였다. 또한 gHMBC 실험을 통해서 olefinic carbon과의 연결을 확인하였을 뿐만 아니라 acetylene carbon과도 강한 연결을 보임으로써 이들 두 작용기 사이에 methylene이 존재함을 확인할 수 있었다. 전체적인 화합물의 구조는  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, gHMBC와 같은 2D NMR 실험을 종합하여 결정하였다. 최종적으로 compound 9는 1,9-Heptadecadiene-4,6-diyne-3-ol로 동정하였으며, 문헌조사 결과 이 화합물은 이전에 분리된 화합물인 falcarinol임이 확인되었다

21).

**Table 2.**  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data for compound 1 and 2

position	compound 1		compound 2	
	$\delta_{\text{H}}$ (H, m., Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (H, m., Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		138.9 s		138.8 s
2	7.34-7.21 (1H, m)	129.0 d	7.34-7.21 (1H, m)	129.1 d
3	7.42-7.31 (1H, m)	129.1 d	7.43-7.37 (1H, m)	129.2 d
4	7.34-7.21 (1H, m)	128.5 d	7.34-7.21 (1H, m)	128.6 d
5	7.42-7.31 (1H, m)	129.1 d	7.43-7.37 (1H, m)	129.2 d
6	7.34-7.21 (1H, m)	129.0 d	7.34-7.21 (1H, m)	129.1 d
7	4.92 (1H, d, 11.7)	71.7 t	4.88 (1H, d, 11.8)	71.8 t
	4.65 (1H, d, 11.7)		4.64 (1H, d, 11.8)	
1'	4.35 (1H, d, 7.4)	103.1 d	4.32 (1H, d, 7.4)	103.1 d
2'	3.38-3.22 (1H, m)	75.0 d	3.33-3.20 (1H, m)	75.0 d
3'	3.38-3.22 (1H, m)	78.0 d	3.33-3.20 (1H, m)	78.0 d
4'	3.38-3.22 (1H, m)	71.6 d	3.33-3.20 (1H, m)	71.7 d
5'	3.38-3.22 (1H, m)	77.9 d	3.38 (1H, m)	76.9 d
6'	3.68 (1H, dd, 12.0, 5.3)	62.7 t	3.62 (1H, dd, 11.2, 6.1)	68.7 t
	3.89 (1H, dd, 12.0, 1.8)		4.00 (1H, dd, 11.2, 1.5)	
1''			5.04 (1H, d, 2.5)	110.9 d
2''			3.93 (1H, d, 2.5)	78.0 d
3''			-	80.5 s
4''			3.77 (1H, d, 9.6)	74.9 t
			3.98 (1H, d, 9.6)	
5''			3.58 (2H, s)	65.5 t

Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

**Table 3. gHMBC spectral data for compound 1 and 2**

position	compound 1 gHMBC	compound 2 gHMBC
1		
2	C-3, C-5, C-7	C-3, C-5, C-7
3	C-2, C-6	C-2, C-6
4	C-2, C-3, C-5, C-6	C-2, C-3, C-5, C-6
5	C-2, C-6	C-2, C-6
6	C-3, C-5, C-7	C-3, C-5, C-7
7	C-1, C-1', C-2, C-6	C-1, C-1', C-2, C-6
1'	C-3', C-7	C-7
2'	C-2'	C-2'
3'	C-2', C-4'	C-2', C-4'
4'	C-3', C-5'	C-3', C-5'
5'	C-4', C-6,	C-4', C-6'
6'	C-4', C-5'	C-1'', C-2''
1''		C-6', C-4''
2''		
3''		
4''		C-1'', C-6
5''		C-4''

Measured in CD<sub>3</sub>OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by <sup>1</sup>H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC experiments.

**Table 4.**  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and gHMBC spectral data for compound **3**

position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1		133.3 s	
2	6.87 (1H, s)	112.9 d	C-4, C-6
3		148.5 s	
4		146.0 s	
5	6.70 (1H, m)	115.8 d	C-1, C-3
6	6.70 (1H, m)	121.5 d	C-2, C-7
7	2.99 (1H, m)	49.7 d	C-1, C-2, C-6, C-8, C-9
8	3.90-3.71 (1H, m) 4.11(1H, dd, 9.8, 5.6)	72.3 t	C-1, C-1', C-7, C-9
9	3.90-3.71 (2H, m)	64.9 t	C-1
1'	4.29 (1H, d, 7.7)	103.1 d	C-8
2'	3.18 (1H, dd, 8.9, 7.9)	75.0 d	C-1', C-3'
3'	3.35-3.24 (1H, m)	78.0 d	
4'	3.35-3.24 (1H, m)	71.6 d	C-3', C-5'
5'	3.35-3.24 (1H, m)	77.9 d	
6'	3.64 (1H, dd, 11.7, 5.5) 3.90-3.71(1H, m)	62.7 t	C-5'
3-OMe	3.84 (3H, s)	56.4 q	C-3

Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC experiments.



**Table 5.**  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data for compound 4 and 5

position	compound 4		compound 5	
	$\delta_{\text{H}}$ (H, m., Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (H, m., Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1				
2		161.1 s		160.3 s
3	6.25 (1H, d, 9.6)	112.5 d	6.27 (1H, d, 9.6)	112.8 d
4	8.13 (1H, d, 9.6)	139.1 d	8.10 (1H, d, 9.6)	139.3 d
5		149.4 s		144.2 s
6		112.6 s		114.7 s
7		158.2 s		149.9 s
8	7.11 (1H, s)	93.8 d		128.1 s
9		152.6 s		143.6 s
10		106.3 s		107.6 s
2'	7.57 (1H, d, 2.0)	144.7 d	7.60 (1H, d, 2.3)	145.0 d
3'	7.00 (1H, d, 2.0)	105.0 d	6.98 (1H, d, 2.3)	105.0 d
5-OMe	4.26 (3H, s)	60.1 q	4.26 (3H, s)	60.9 q
8-OMe			4.15 (3H, s)	61.7 q

Measured in  $\text{CDCl}_3$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

**Table 6. gHMBC spectral data for compound 4 and 5**

position	compound 4 gHMBC	compound 5 gHMBC
1		
2		
3	C-2, C-10	C-2, C-10
4	C-2, C-9	C-2, C-8, C-9
5		
6		
7		
8	C-6, C-7, C-9, C-10	
9		
10		
2'	C-6, C-7	C-3', C-6, C-7
3'	C-2', C-6	C-2', C-6, C-7
5-OMe	C-5	C-5
8-OMe		C-8

Measured in CDCl<sub>3</sub> at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by <sup>1</sup>H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

**Table 7.  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and gHMBC spectral data for compound 6**

position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1			
2		160.3 s	
3	6.36 (1H, d, 9.5)	114.7 d	C-2, C-10
4	7.75 (1H, d, 9.5)	144.2 d	C-2, C-3, C-10
5	7.36 (1H, s)	112.8 d	C-7, C-9
6		126.0 s	
7		147.5 s	
8		132.7 d	
9		142.8 s	
10		116.4 s	
2'	7.67 (1H, d, 2.0)	146.5 d	C-6, C-7
3'	6.80 (1H, d, 2.0)	106.7 d	C-2', C-6
8-OMe	4.29 (3H, s)	61.3 q	C-8

Measured in  $\text{CDCl}_3$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC experiments.

**Table 8.  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and gHMBC spectral data for compound 7**

position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1			
2		160.4 s	
3	6.36 (1H, d, 9.6)	114.6 d	C-2, C-10
4	7.75 (1H, d, 9.6)	144.2 d	C-2, C-3, C-9
5	7.33 (1H, s)	113.1 d	C-3', C-7, C-9
6		125.7 s	
7		148.4 s	
8		131.5 d	
9		143.6 s	
10		116.4 s	
2'	7.67 (1H, d, 2.0)	146.5 d	C-6, C-7
3'	6.79 (1H, d, 2.0)	106.7 d	C-6, C-7
1''	4.99 (2H, d, 7.2)	70.1 t	C-2'', C-3'', C-8
2''	5.62 (1H, t, 7.2)	119.6 d	
3''		139.7 s	
4''	1.71 (3H, s)	25.9 q	C-2'', C-3'', C-4'', C-5''
5''	1.73 (3H, s)	18.2 q	C-3'', C-4''

Measured in  $\text{CDCl}_3$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC experiments.

**Table 9.  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and gHMBC spectral data for compound 8**

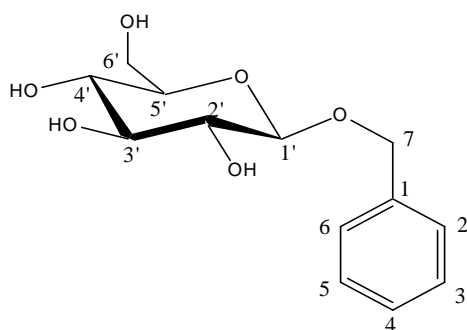
position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1	5.47 (1H, ddd, 17.1, 1.2, 1.0)	117.3 t	C-3
	5.25 (1H, ddd, 10.2, 1.2, 1.0)		
2	5.93 (1H, ddd, 17.1, 10.2, 5.2)	135.7 d	C-4
3	4.93 (1H, brs)	63.5 d	
4		78.2 s	
5		70.3 s	
6		68.7 s	
7		79.8 s	
8	5.19 (1H, brd, 8.0)	58.6 d	C-7
9	5.51 (1H, m)	127.6 d	
10	5.61 (1H, m)	134.6 d	
11	2.10 (2H, m)	27.8 t	C-9, C-10, C-12
12	1.38 (2H, m)	29.4 t	C-12~17
13	1.27 (2H, m)	29.2 t	C-12~17
14	1.27 (2H, m)	29.3 t	C-12~17
15	1.27 (2H, m)	31.9 t	C-12~17
16	1.27 (2H, m)	22.7 t	C-12~17
17	0.88 (3H, t, 6.9)	14.2 q	C-15, C-16

Measured in  $\text{CDCl}_3$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC experiments.

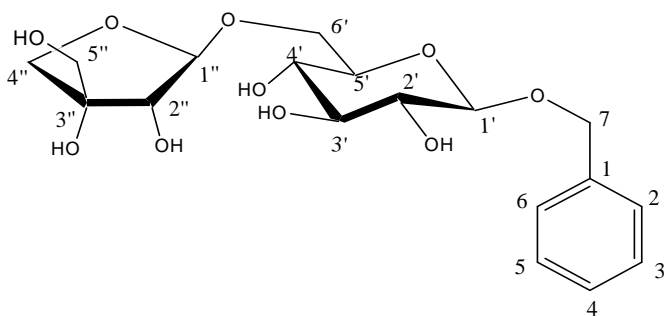
**Table 10.**  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and gHMBC spectral data for compound **9**

position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1	5.44 (1H, dt, 17.1, 1.2, 1.0)	116.9 t	C-2, C-3
	5.21 (1H, dt, 10.2, 1.2, 1.0)		
2	5.91 (1H, ddd, 17.1, 10.2, 5.5)	136.0 d	C-3, C-4
3	4.90 (1H, brs)	63.5 d	C-1, C-2, C-3, C-4 C-5, C-6
4		74.2 s	
5		71.3 s	
6		64.0 s	
7		80.2 s	
8	3.01 (2H, d, 6.6)	17.8 t	C-5, C-6, C-7, C-9, C-10
9	5.35 (1H, m)	121.8 d	C-7, C-8, C-11
10	5.50 (1H, m)	132.9 d	C-11
11	2.01 (2H, m)	27.2 t	C-9, C-10
12	1.27 (2H, m)	29.3 t	C-12~17
13	1.27 (2H, m)	29.2 t	C-12~17
14	1.27 (2H, m)	29.2 t	C-12~17
15	1.27 (2H, m)	31.9 t	C-12~17
16	1.27 (2H, m)	22.7 t	C-12~17
17	0.88 (3H, t, 6.9)	14.2 q	C-15, C-16

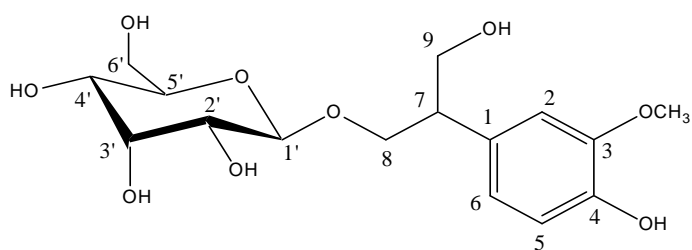
Measured in  $\text{CDCl}_3$  at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC experiments.



**Compound 1**

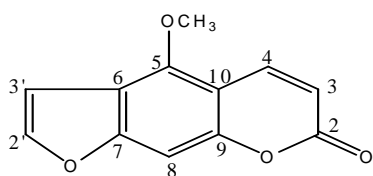


**Compound 2**

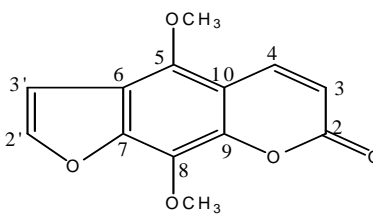


**Compound 3**

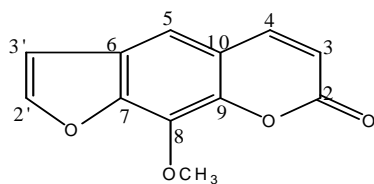
**Fig. 5. Chemical structure of compounds 1-3 from *Glehnia littoralis*.**



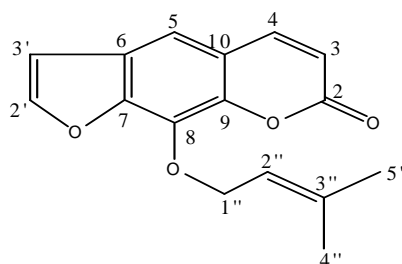
**Compound 4**



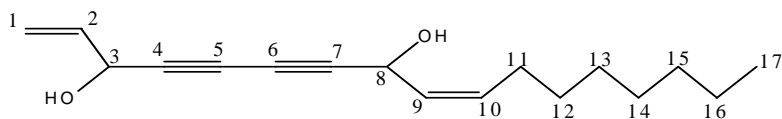
**Compound 5**



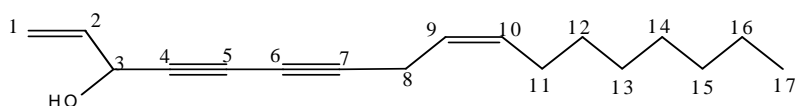
**Compound 6**



**Compound 7**



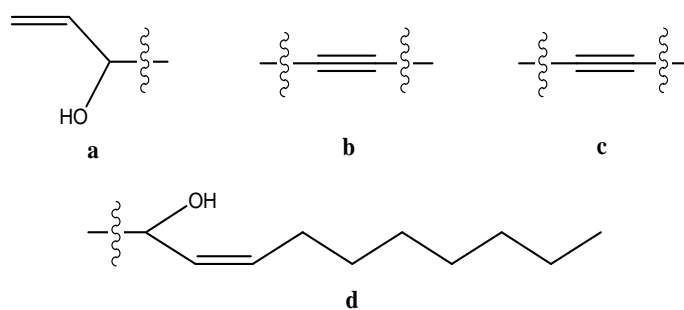
**Compound 8**



**Compound 9**

**Fig. 6. Chemical structure of compounds 4-9 from *Glehnia littoralis*.**





**Fig. 7. Chemical partial structure of compound 8 from *Glehnia littoralis*.**

Compound **1** : colorless gum;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  :  $-45.83^{\circ}$  ( $c$  0.24, MeOH); IR (ATR) :  $\nu_{\text{max}}$ =3368, 2922, 2873, 1714-1626, 1074, 1022, 739, 699  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 332, 263, 214;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 2; FAB-MS  $m/z$  (rel, int) 271  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$

Compound **2** : colorless gum;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  :  $-60.0^{\circ}$  ( $c$  0.17, MeOH); IR (ATR) :  $\nu_{\text{max}}$ =3369, 2926, 2882, 1651, 1496-1218, 1048, 1011, 825  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 262, 210;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 2; EI-MS  $m/z$  402  $[\text{M}]^{+}$ , 355, 295, 247, 223, 191

Compound **3** : colorless gum;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  :  $+6.0^{\circ}$  ( $c$  0.17, MeOH); IR (ATR) :  $\nu_{\text{max}}$ =3350, 2942, 2885, 1603, 1518, 1454-1370, 1273, 1075, 1032,  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 282, 226, 210;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 4; FAB-MS  $m/z$  (rel, int) 361  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$

Compound **4** : yellow crystal; mp :  $185-187^{\circ}$ ; IR (ATR):  $\nu_{\text{max}}$ =3147-3089, 1735, 1625-1577, 1472, 1360, 1215-1079  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 310, 269, 251;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 5; EI-MS  $m/z$  216  $[\text{M}]^{+}$ , 201, 188, 173, 145

Compound **5** : pale yellow crystal;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  :  $+9.52^{\circ}$  ( $c$  0.21, MeOH); IR (ATR) :  $\nu_{\text{max}}$ =3400 - 3300, 2975, 2930, 1645, 1470, 1375, 1220  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 313, 270, 250, 243, 223  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 5; EI-MS  $m/z$  246  $[\text{M}]^{+}$ , 231, 203, 188, 175

Compound **6** : pale yellow crystal;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  :  $+9.52^{\circ}$  ( $c$  0.21, MeOH); mp :  $146-148^{\circ}$ ; IR (ATR):  $\nu_{\text{max}}$ =1710, 1620, 1586, 1155, 821  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 301, 246, 224;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 7; EI-MS  $m/z$  216  $[\text{M}]^{+}$ , 201, 188, 173, 145

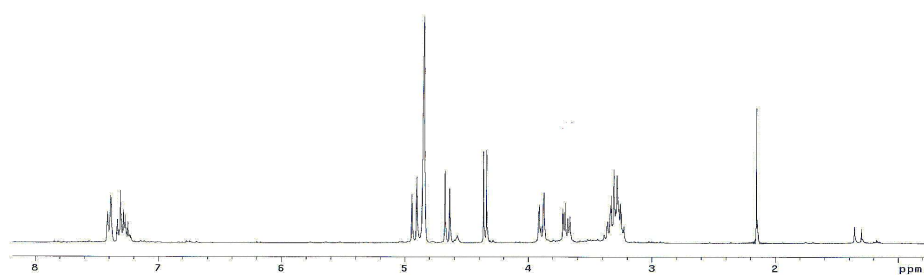
Compound **7** : pale yellow crystal; mp :  $97.5-99^{\circ}$ ; IR (ATR) :  $\nu_{\text{max}}$ =1722, 1707,

1587, 1150, 838  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 301, 237;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 8;

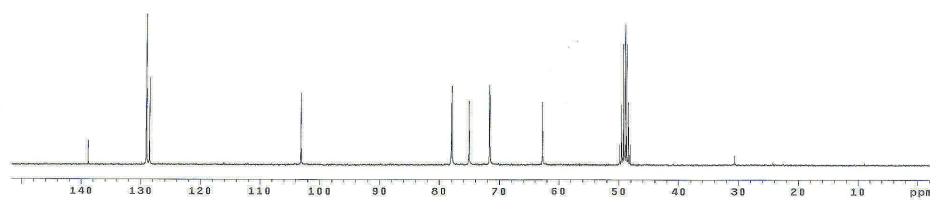
EI-MS  $m/z$  270  $[\text{M}]^+$ , 202, 174, 146, 145, 115

Compound **8** : yellow oil;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  : +280  $^{\circ}$  ( $c$  0.15,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (ATR) :  $\nu_{\text{max}}$ =1722, 1707, 1587, 1150, 838  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 296, 276, 262, 248;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 9; EI-MS  $m/z$  260  $[\text{M}]^+$ , 242, 171, 157, 129, 128, 115, 91

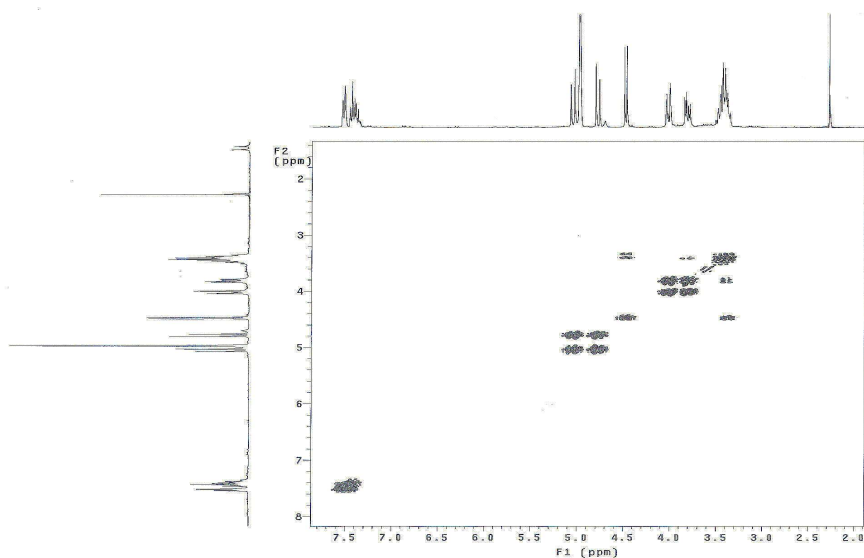
Compound **9** : yellow oil;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  : -34.29  $^{\circ}$  ( $c$  0.23,  $\text{CHCl}_3$ ); IR (ATR) :  $\nu_{\text{max}}$ =1722, 1707, 1587, 1150, 838  $\text{cm}^{-1}$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm : 287, 271, 256, ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Table 10; HREIMS  $m/z$  244.1827  $[\text{M}]^+$



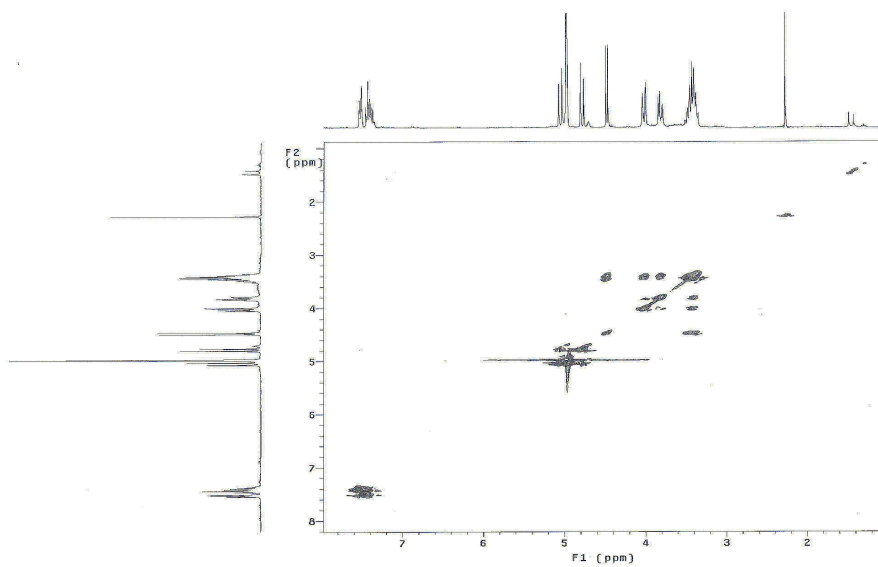
**Fig. 8.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



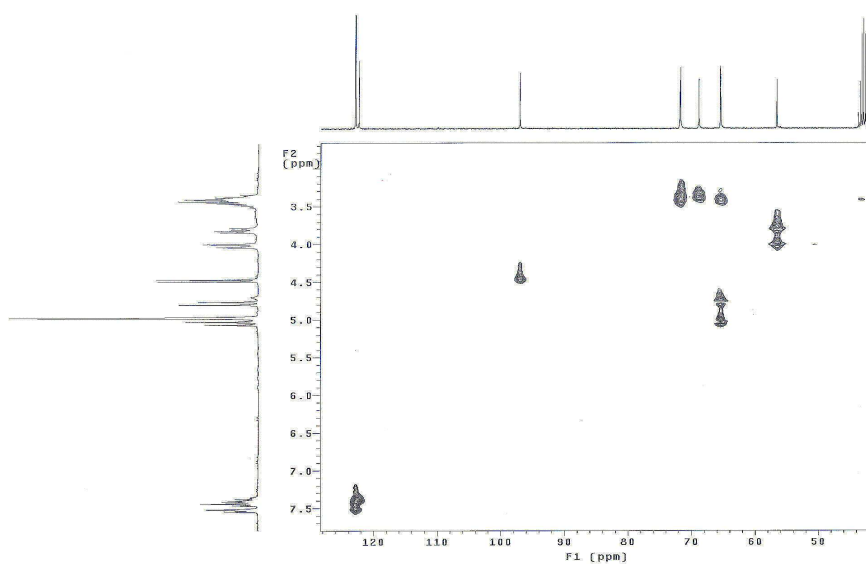
**Fig. 9.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



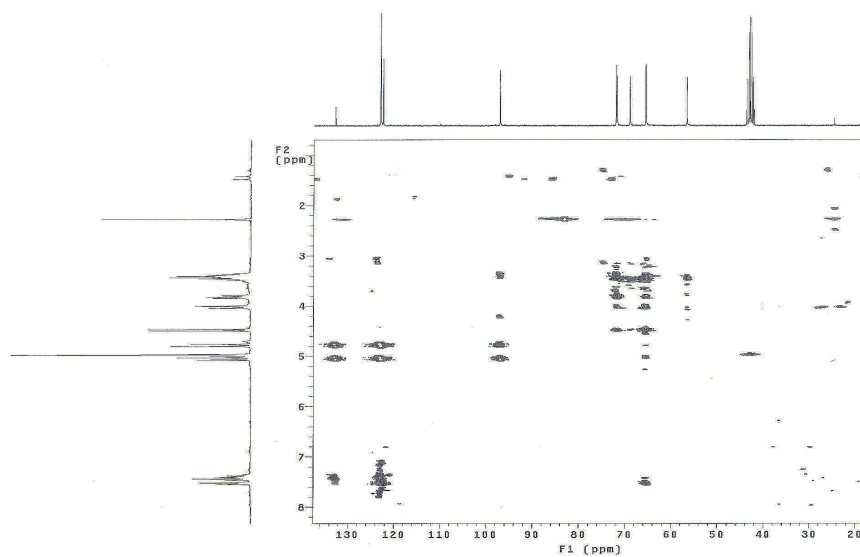
**Fig. 10. gDQCOSY spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.**




**Fig. 11. TOCSY spectrum of compound 1 in CD<sub>3</sub>OD.**



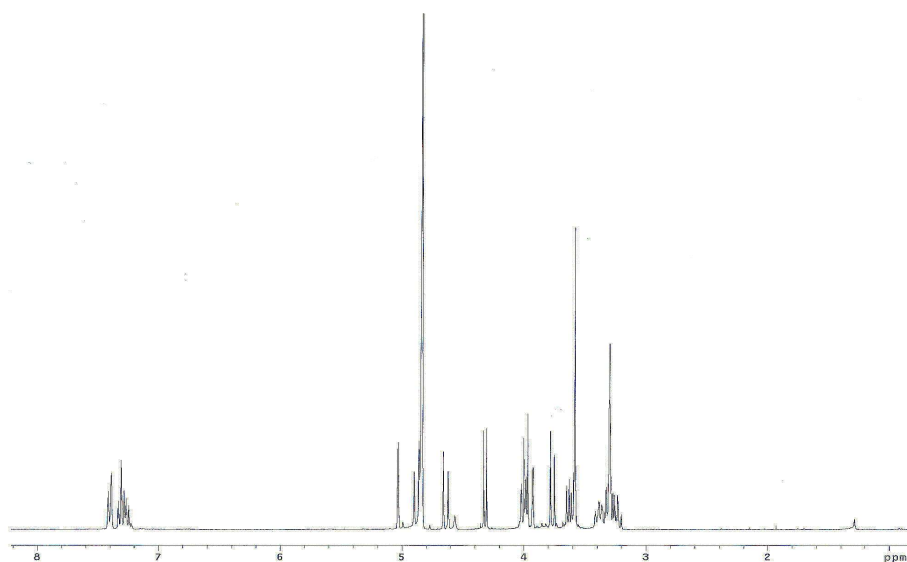
**Fig. 12** gHMQC spectrum of compound **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



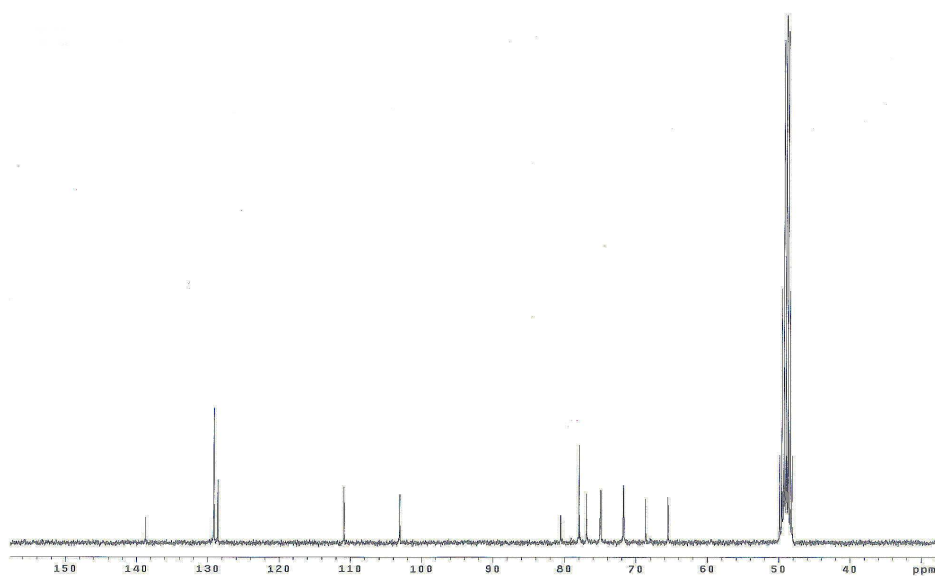
**Fig. 13.** gHMBC spectrum of compound **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Fig. 14.** NOESY correlation of key protons for compound 1.

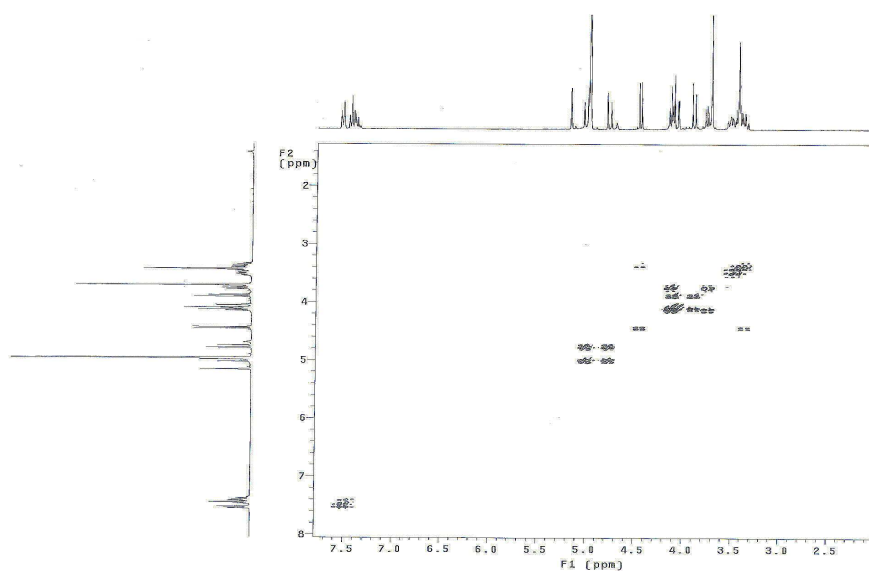


**Fig. 15.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

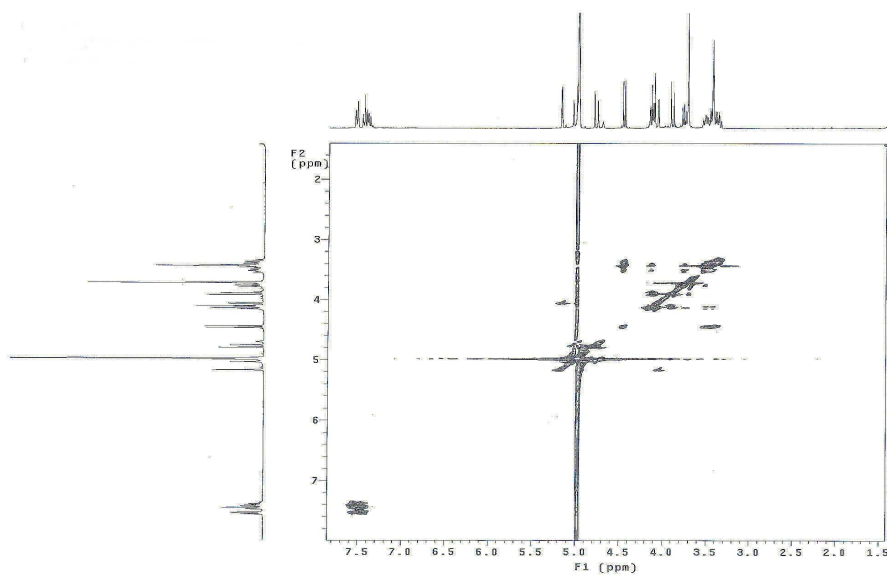


**Fig. 16.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

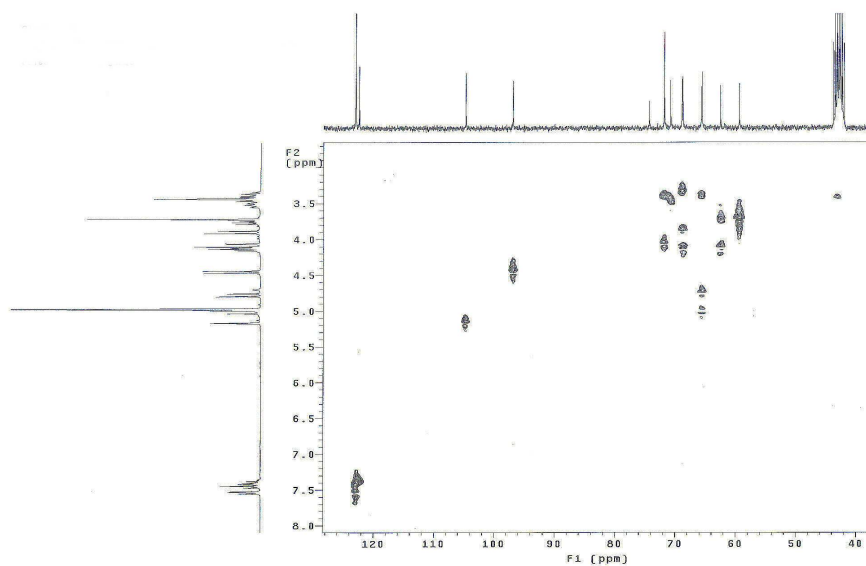




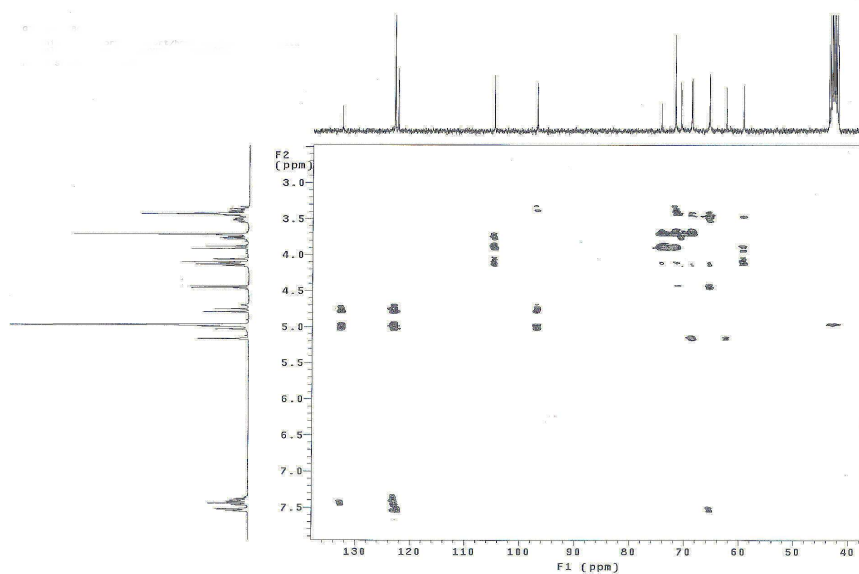
**Fig. 17.** gDQCOSY spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.



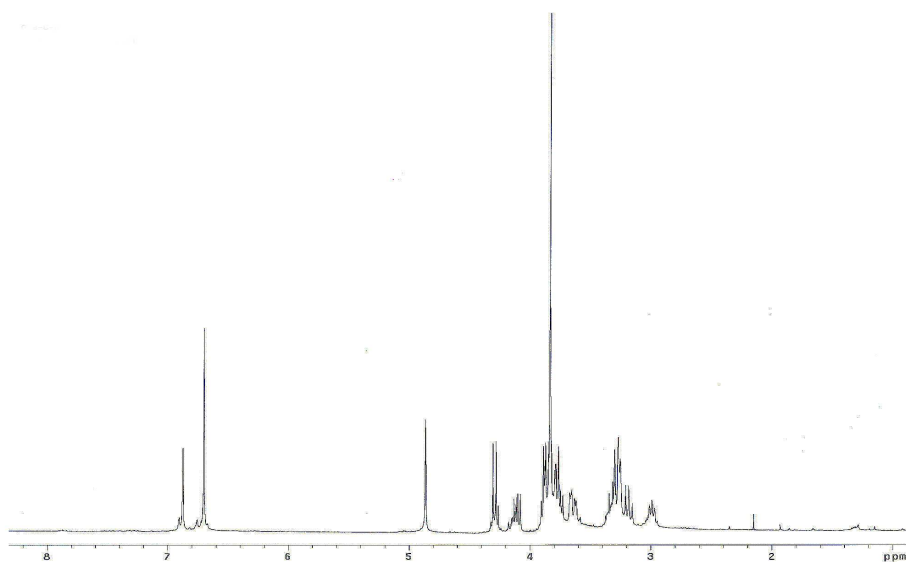
**Fig. 18.** TOCSY spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.



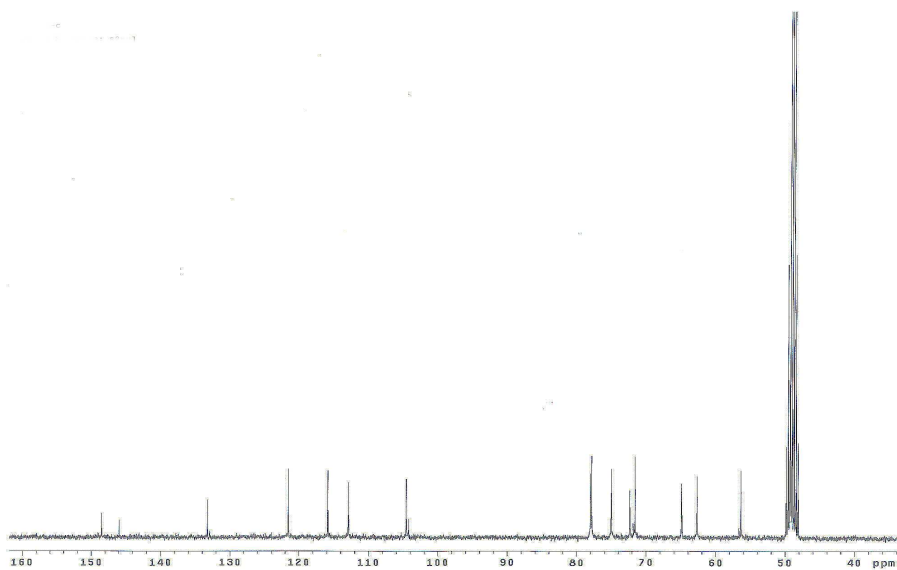
**Fig. 19. gHMQC spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.**



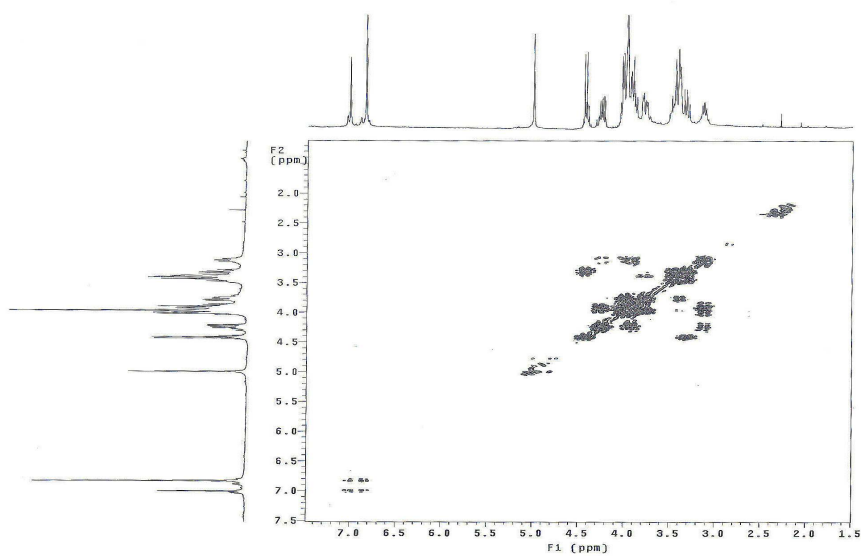
**Fig. 20. gHMBC spectrum of compound 2 in CD<sub>3</sub>OD.**



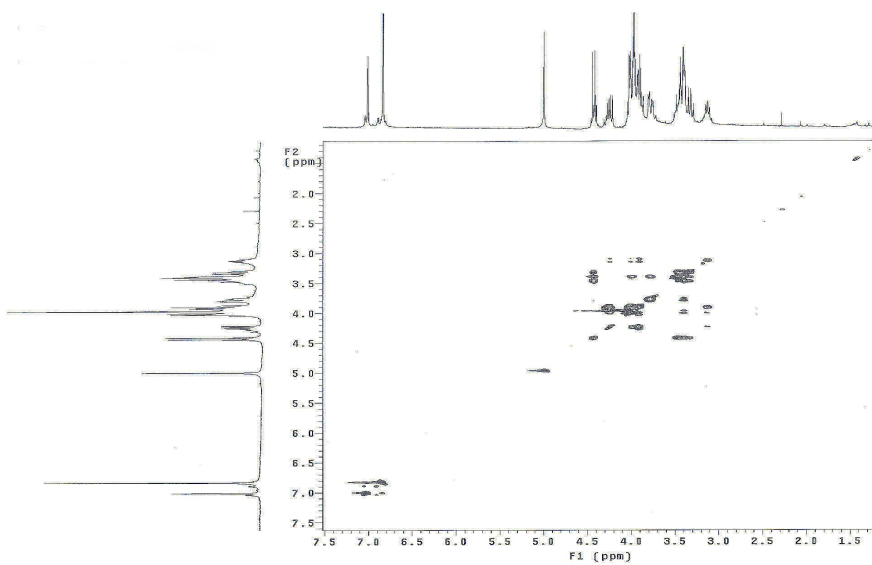
**Fig. 21.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



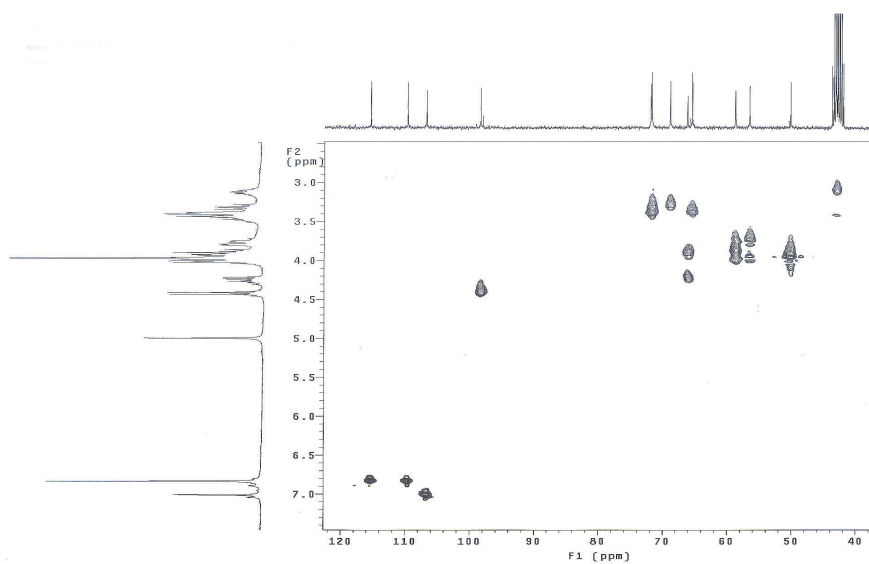
**Fig. 22.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



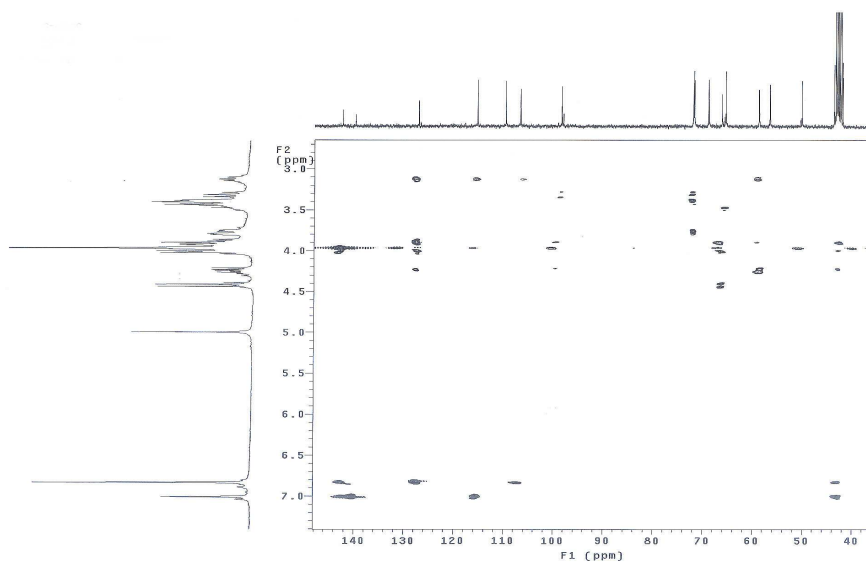
**Fig. 23.** gDQCOSY spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.



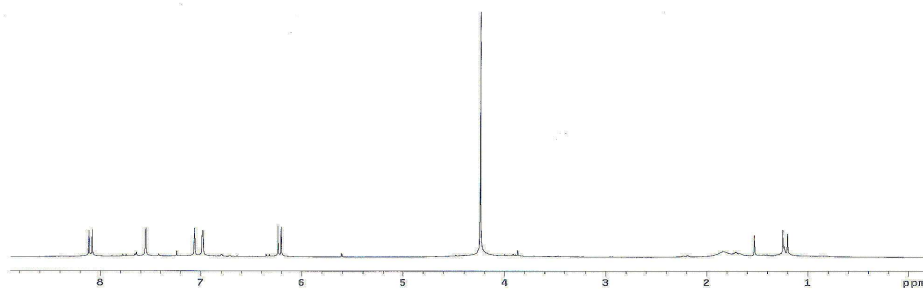
**Fig. 24.** TOCSY spectrum of compound 3 in CD<sub>3</sub>OD.



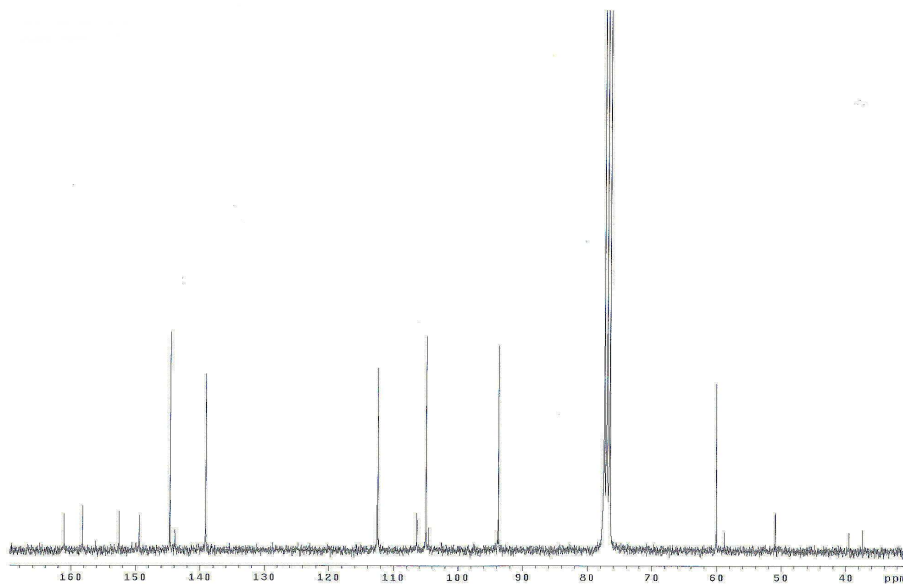
**Fig. 25.** gHMQC spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



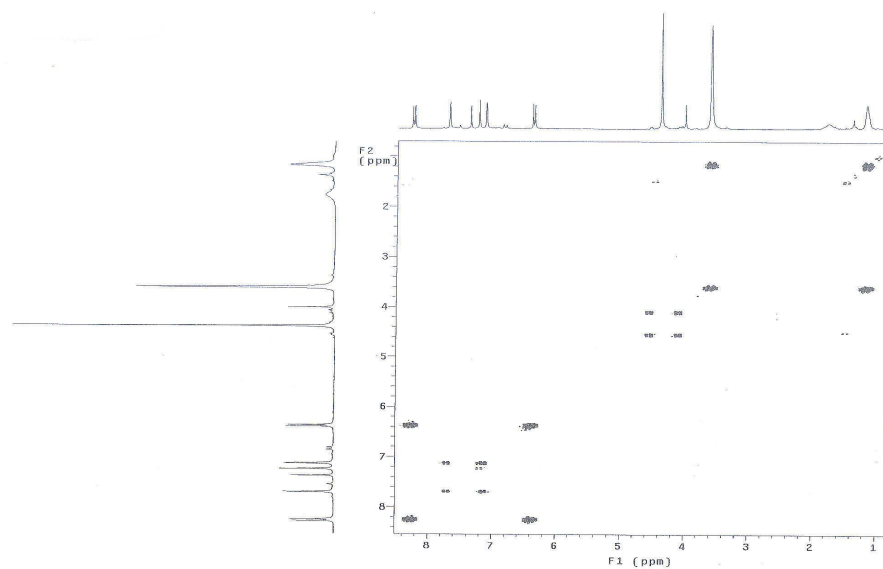
**Fig. 26.** gHMBC spectrum of compound 3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



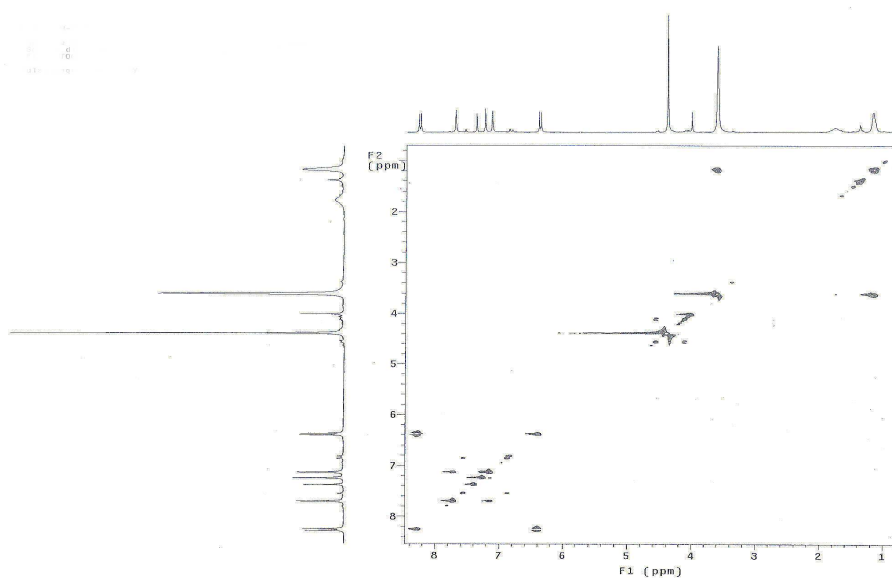
**Fig. 27.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$ .



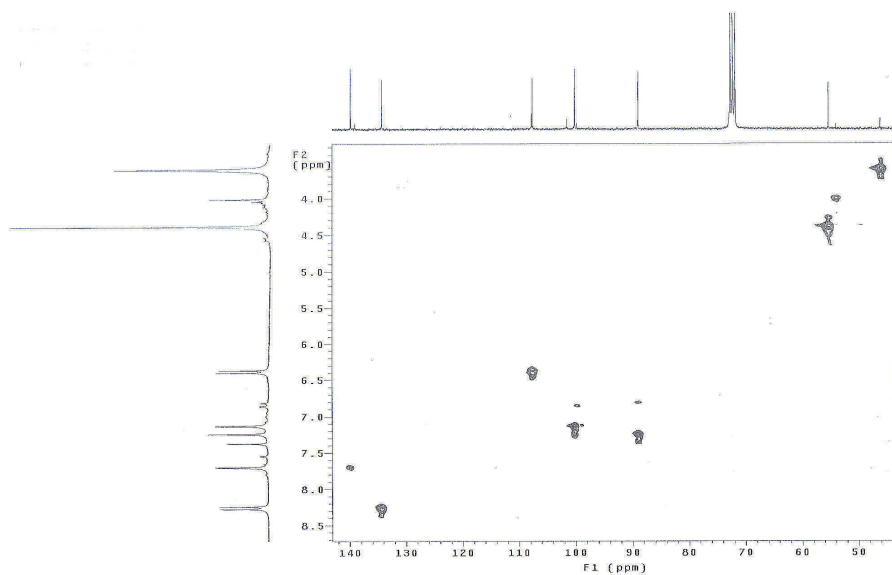
**Fig. 28.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 4 in  $\text{CDCl}_3$ .



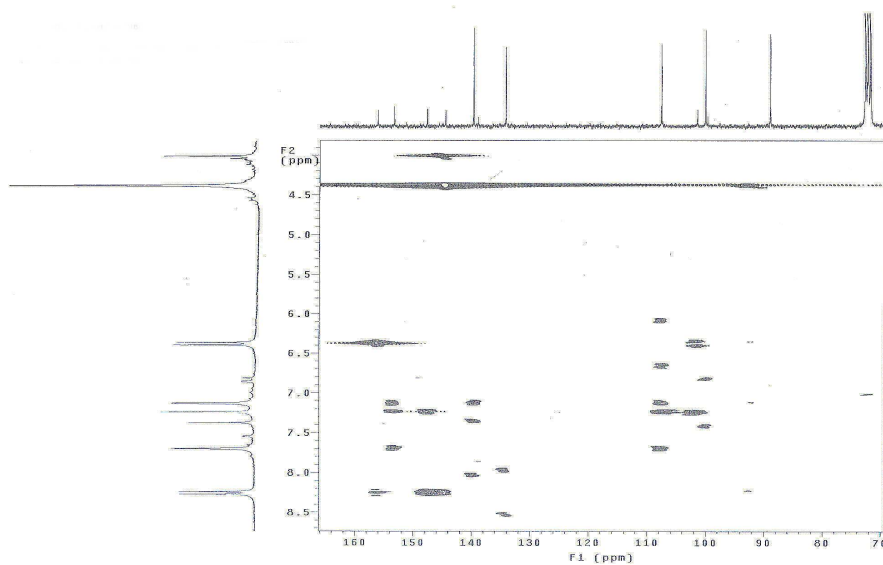
**Fig. 29.** gDQCOSY spectrum of compound **4** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Fig. 30.** TOCSY spectrum of compound **4** in  $\text{CDCl}_3$ .

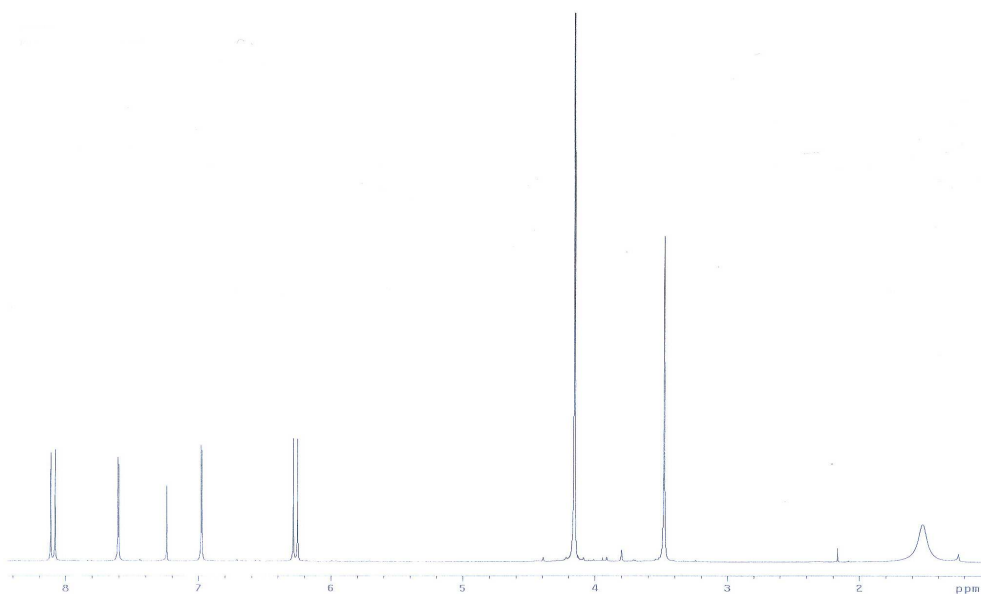


**Fig. 31.** gHMQC spectrum of compound **4** in  $\text{CDCl}_3$ .

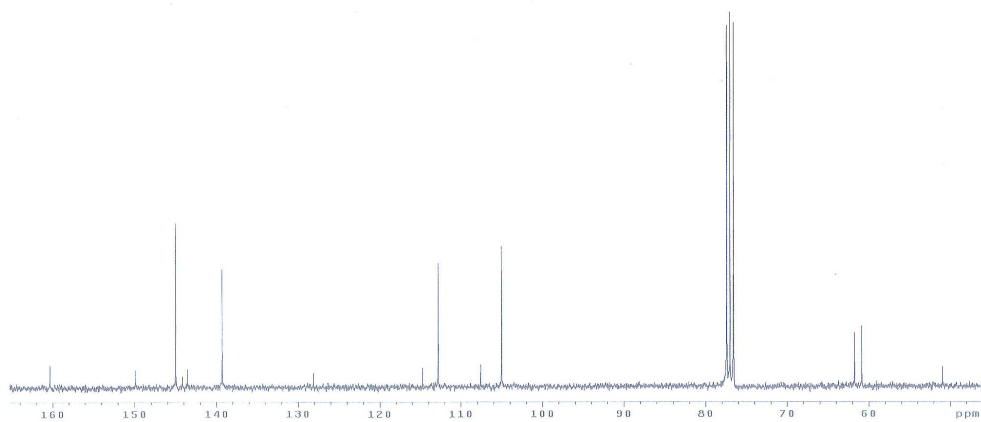


**Fig. 32.** gHMBC spectrum of compound **4** in  $\text{CDCl}_3$ .

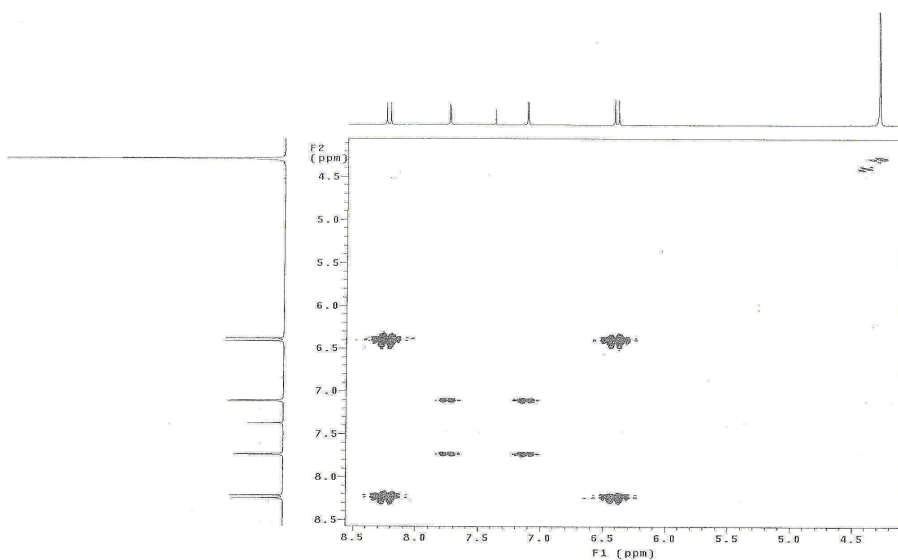




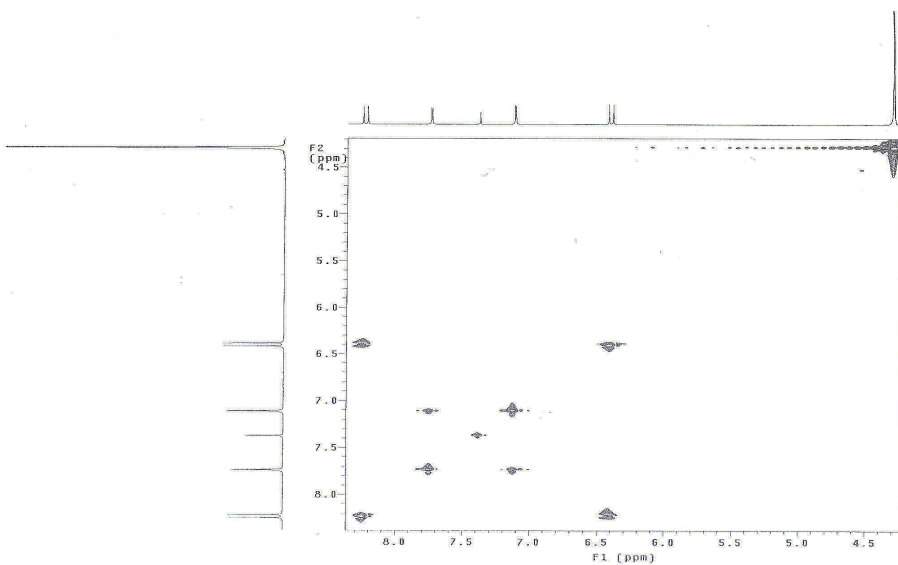
**Fig. 33.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CDCl}_3$ .



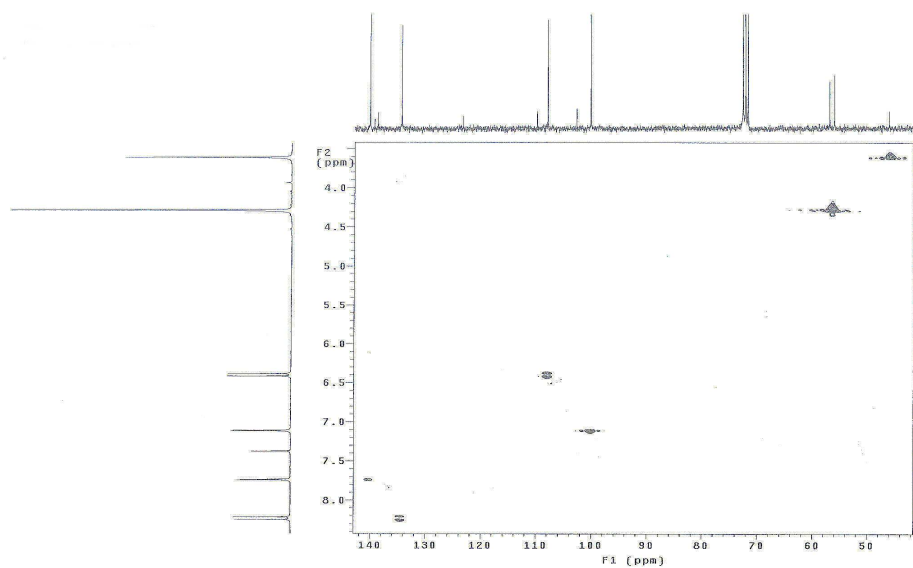
**Fig. 34.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 5 in  $\text{CDCl}_3$ .



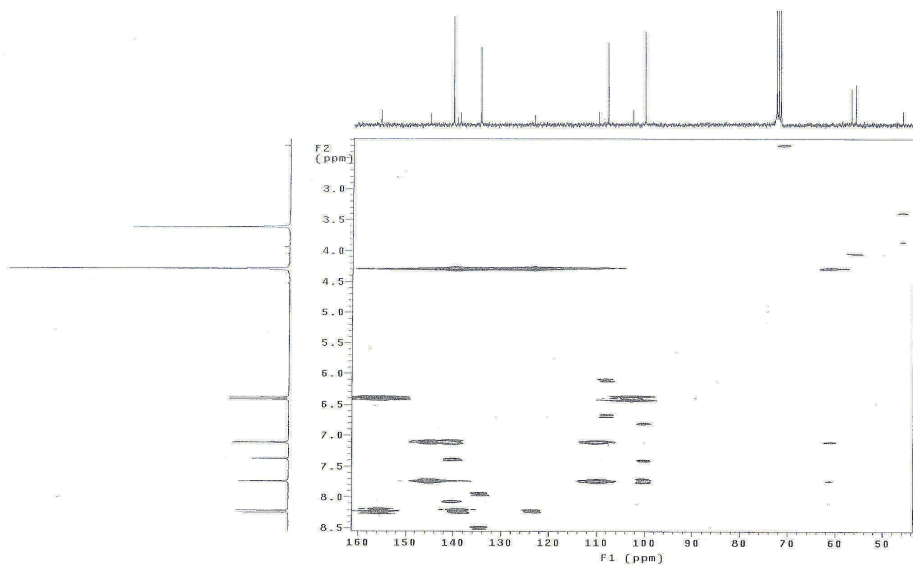
**Fig. 35.** gDQCOSY spectrum of compound **5** in  $\text{CDCl}_3$ .



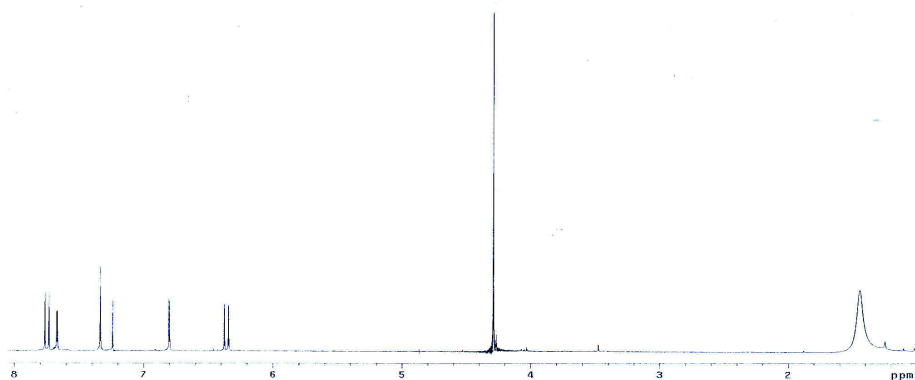
**Fig. 36.** TOCSY spectrum of compound **5** in  $\text{CDCl}_3$ .



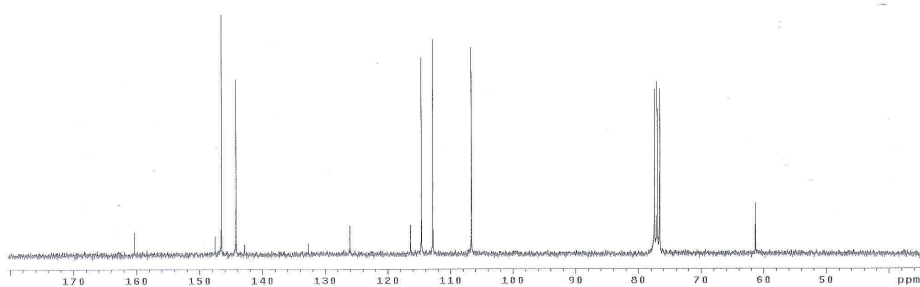
**Fig. 37.** gHMQC spectrum of compound **5** in  $\text{CDCl}_3$ .



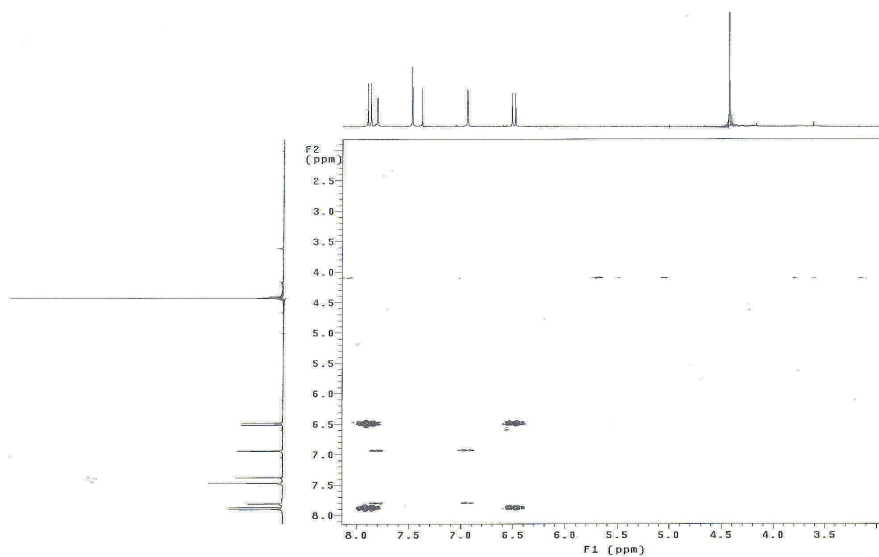
**Fig. 38.** gHMBC spectrum of compound **5** in  $\text{CDCl}_3$ .



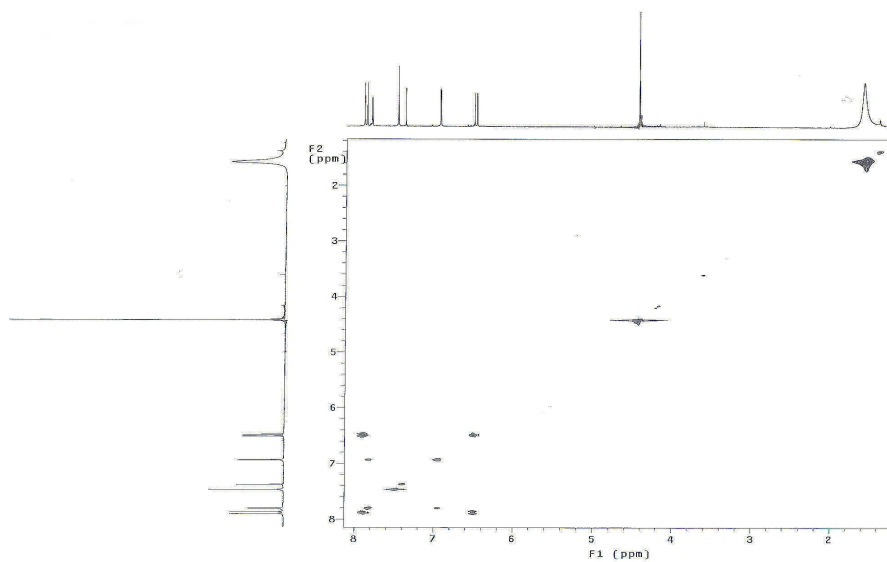
**Fig. 39.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 6 in  $\text{CDCl}_3$ .



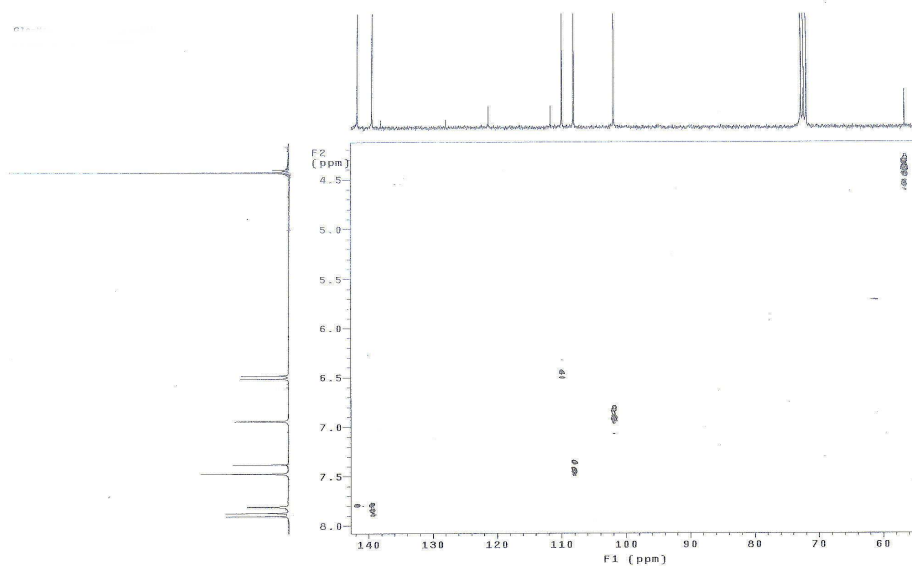
**Fig. 40.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 6 in  $\text{CDCl}_3$ .



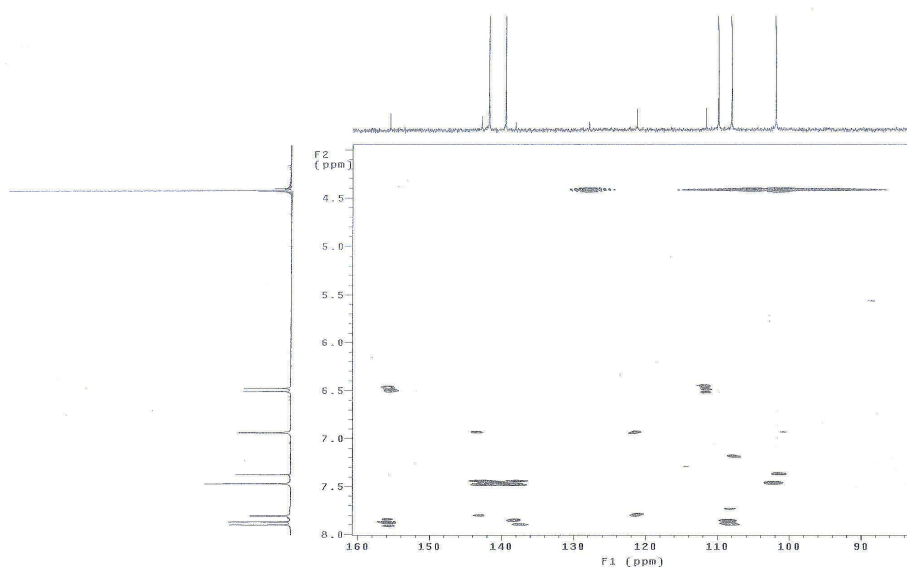
**Fig. 41.** gDQCOSY spectrum of compound **6** in  $\text{CDCl}_3$ .



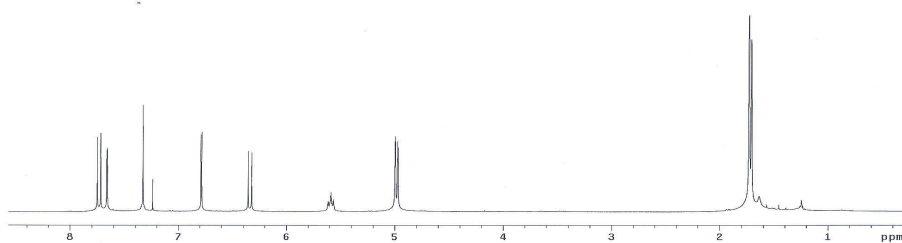
**Fig. 42.** TOCSY spectrum of compound **6** in  $\text{CDCl}_3$ .



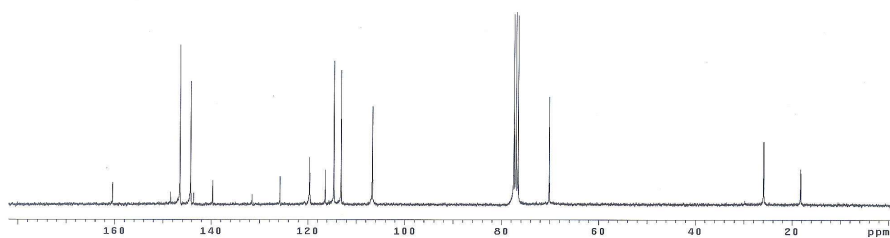
**Fig. 43.** gHMQC spectrum of compound 6 in  $\text{CDCl}_3$ .



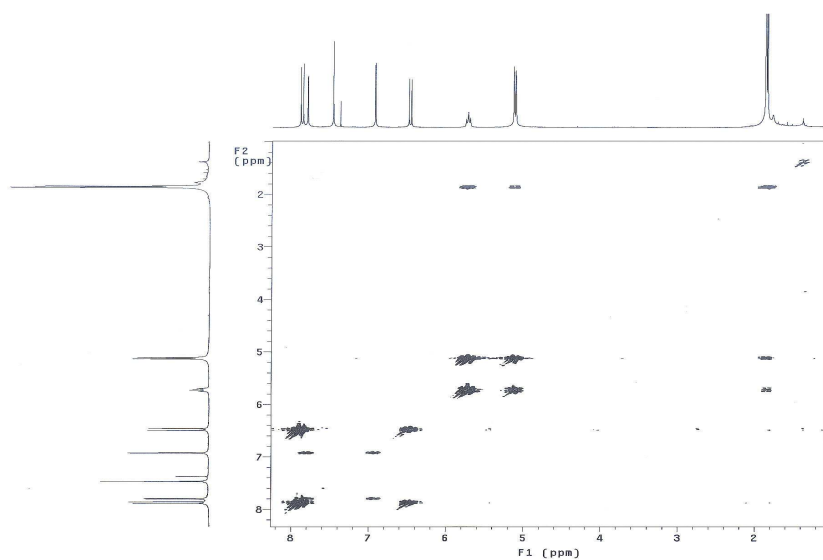
**Fig. 44.** gHMBC spectrum of compound 6 in  $\text{CDCl}_3$ .



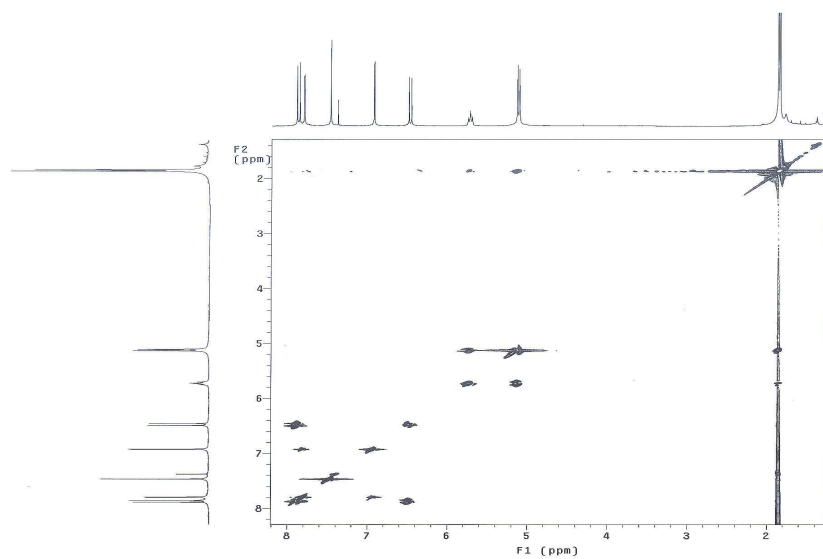
**Fig. 45.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 7 in  $\text{CDCl}_3$ .



**Fig. 46.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 7 in  $\text{CDCl}_3$ .

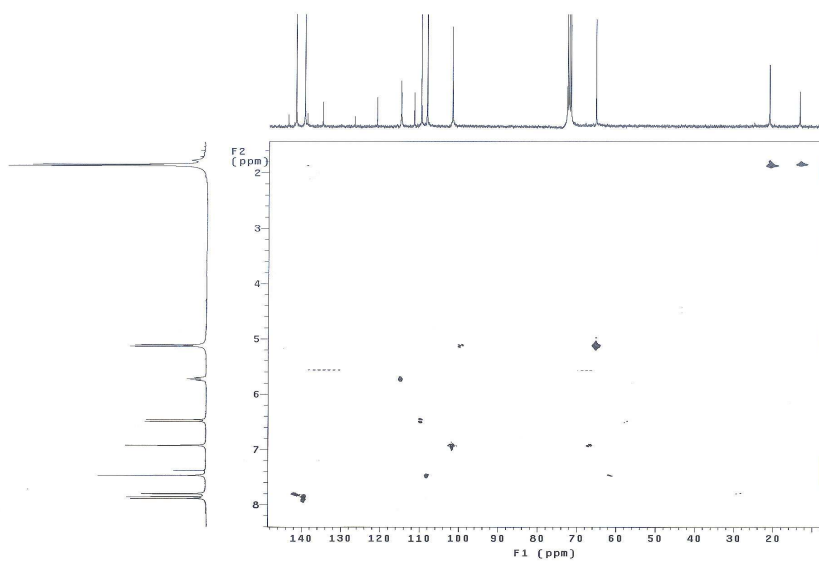


**Fig. 47.** gDQCOSY spectrum of compound **7** in  $\text{CDCl}_3$ .

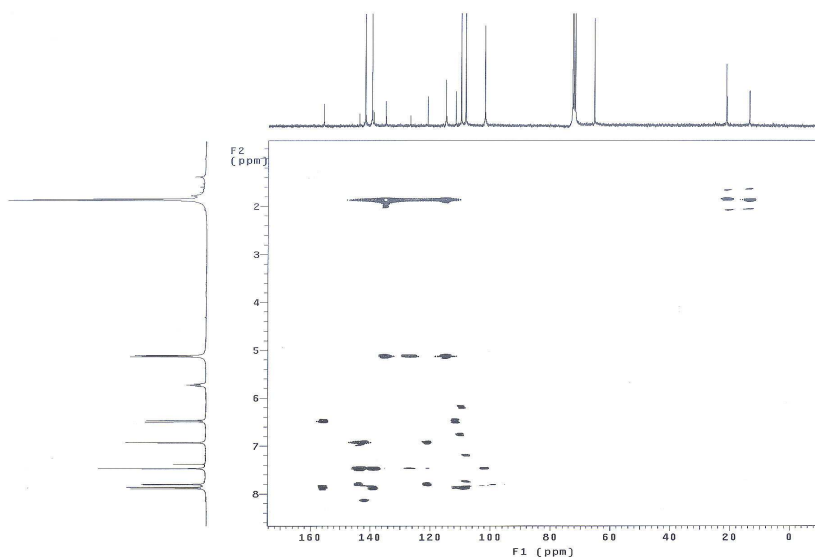


**Fig. 48.** TOCSY spectrum of compound **7** in  $\text{CDCl}_3$ .

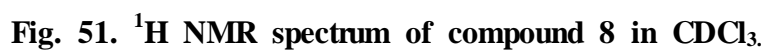


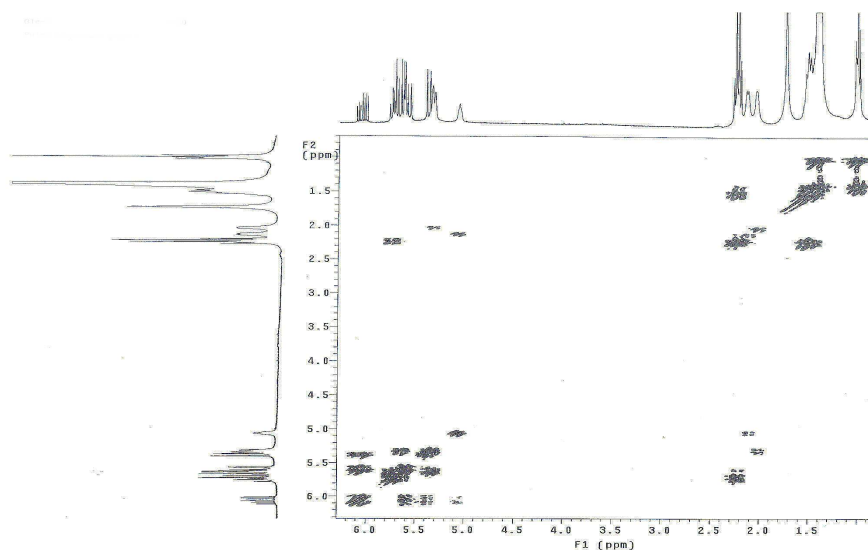


**Fig. 48. gHMQC spectrum of compound 7 in CDCl<sub>3</sub>.**

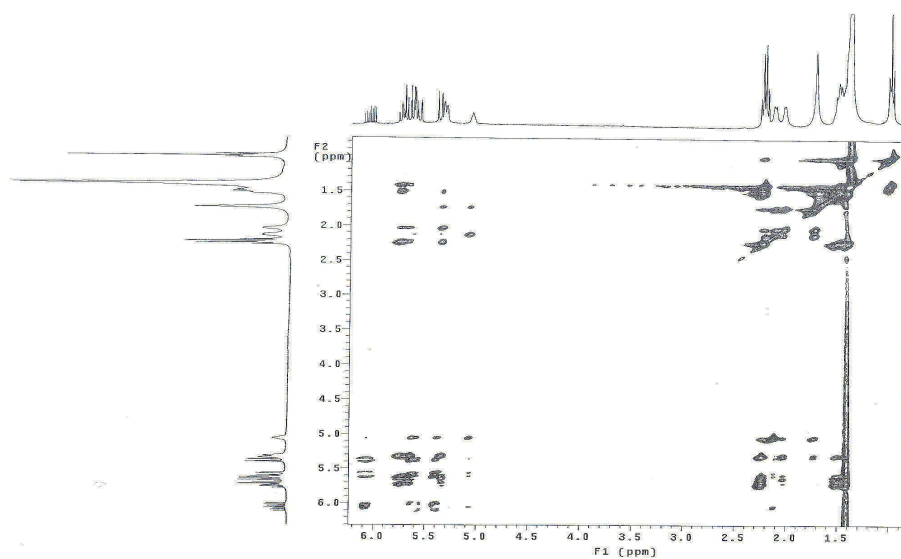


**Fig. 50. gHMBC spectrum of compound 7 in CDCl<sub>3</sub>.**

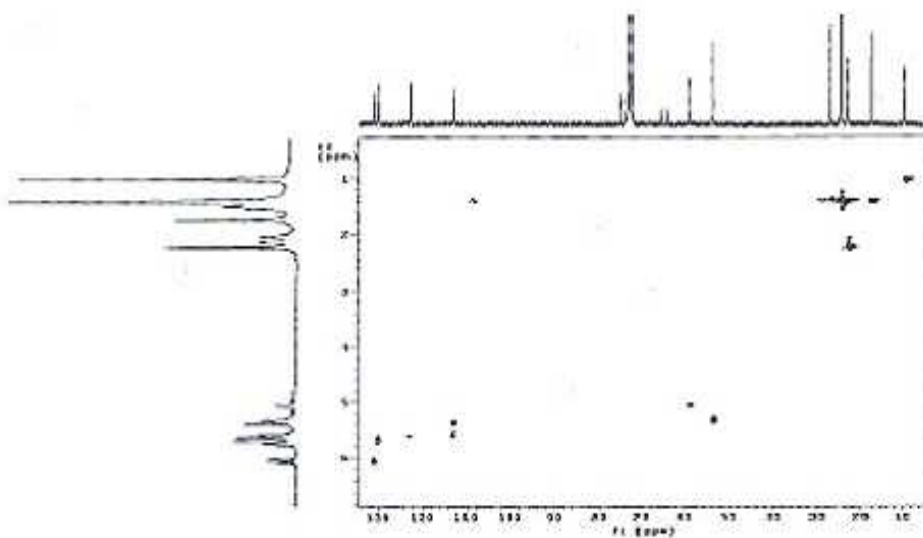




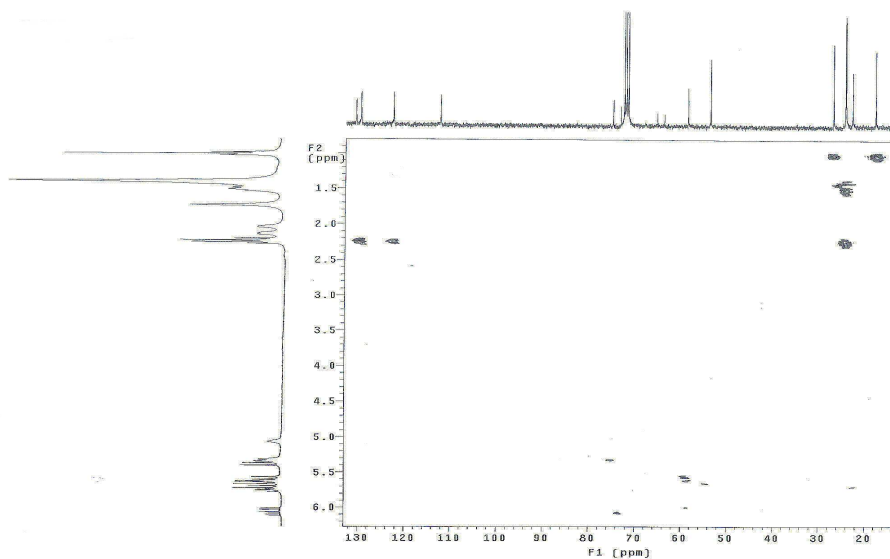
**Fig. 53.** gDQCOSY spectrum of compound **8** in  $\text{CDCl}_3$ .



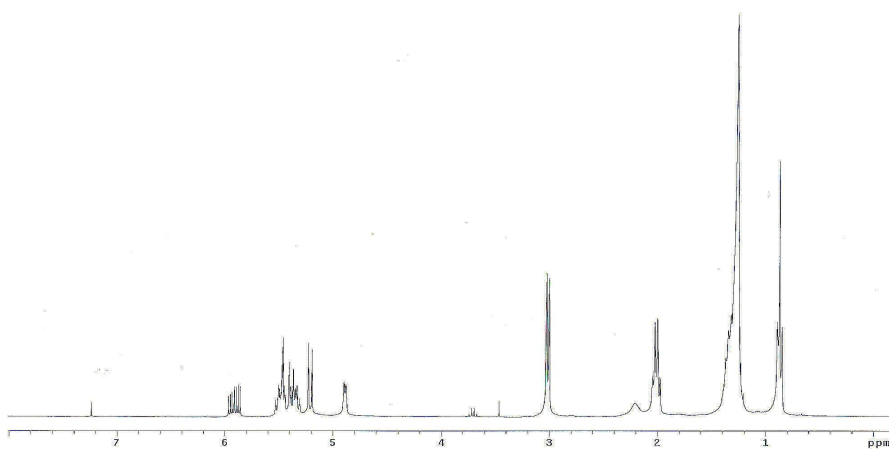
**Fig. 54.** TOCSY spectrum of compound **8** in  $\text{CDCl}_3$ .



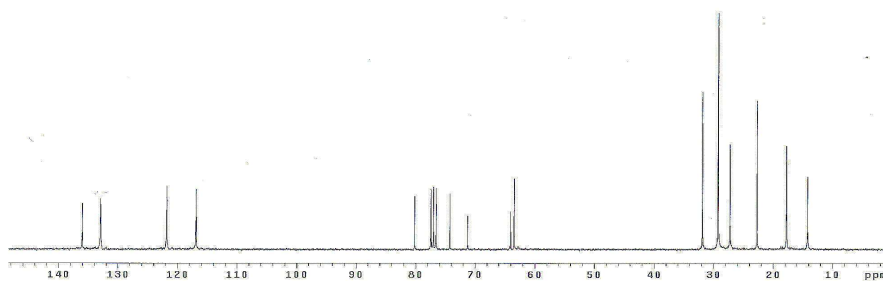
**Fig. 55.** gHMQC spectrum of compound **8** in  $\text{CDCl}_3$ .



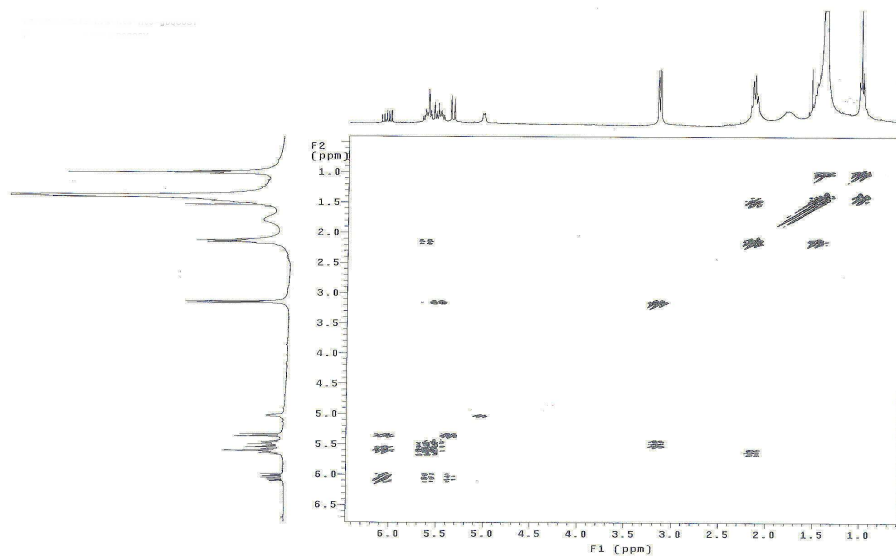
**Fig. 56.** gHMBC spectrum of compound **8** in  $\text{CDCl}_3$ .



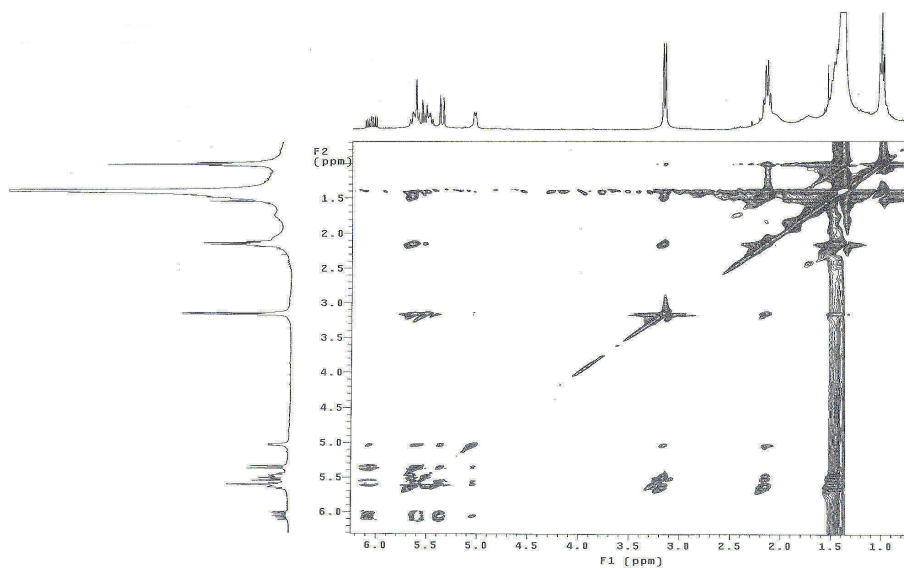
**Fig. 57.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 9 in  $\text{CDCl}_3$ .



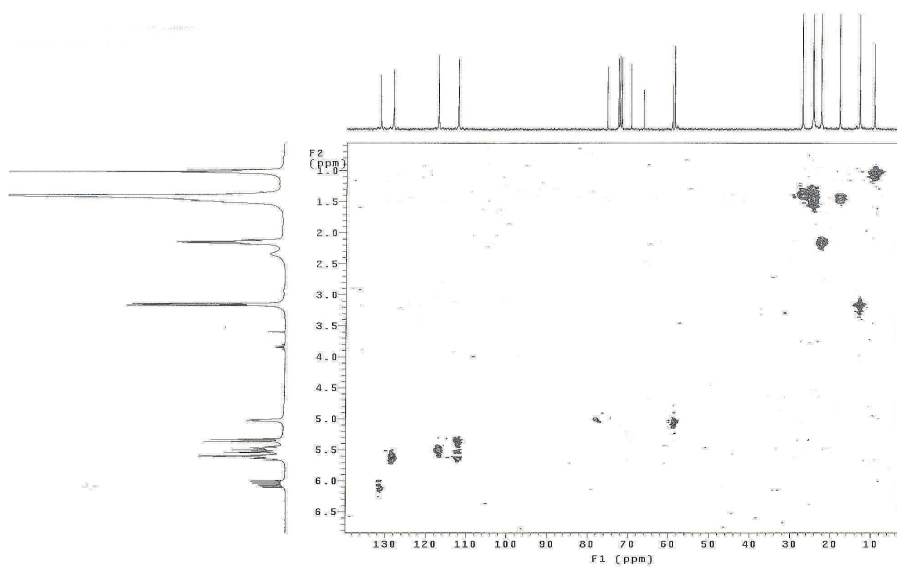
**Fig. 58.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 9 in  $\text{CDCl}_3$ .



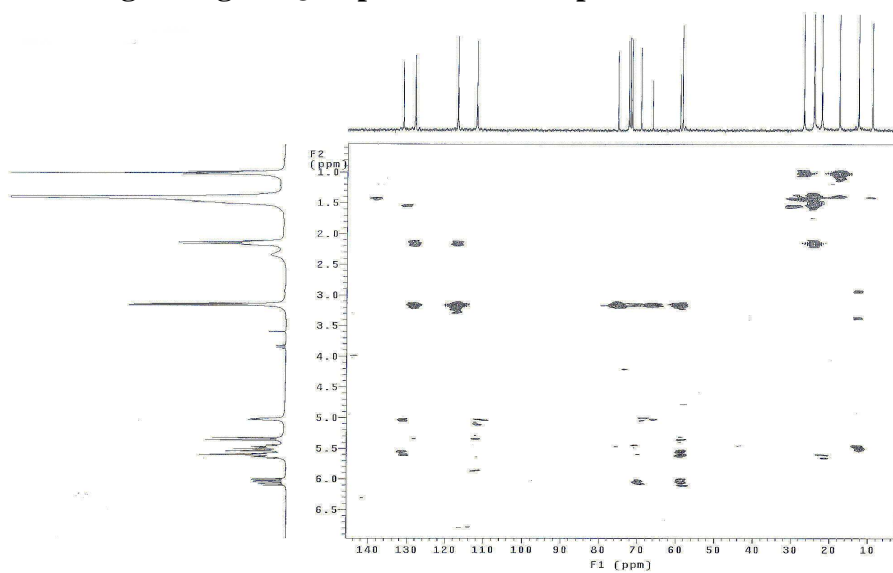
**Fig. 59.** gDQCOSY spectrum of compound **9** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Fig. 60.** TOCSY spectrum of compound **9** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Fig. 61.** gHMQC spectrum of compound **9** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Fig. 62.** gHMBC spectrum of compound **9** in  $\text{CDCl}_3$ .

### 3-2. 항산화 활성

#### (1) 갯방풍의 용매 분획 활성

##### 1) DPPH radical 소거 활성

갯방풍을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 추출하여 얻어진 조추출물과 MeOH 용매로 추출한 조추출물을 혼합한 후에 사용하는 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 얻어진 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$  fractions을 각각 100, 50, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid와 합성 항산화제인 BHA를 사용하였다.

검색결과, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군 L-ascorbic acid는 96.35%의 소거 효과를 보였으며, BHA는 89.75 %의 소거 효과를 나타내었다. 4개의 fractions 중에서는 *n*-BuOH fraction이 46.67 %로 가장 높은 radical 소거 활성 효과를 나타내었으며, 85% aq.MeOH (22.19%),  $\text{H}_2\text{O}$  (14.90%) *n*-hexane (14.58%) fractions의 순서로 소거 활성 효과가 나타났다 (Table 10).

DPPH radical 소거 활성을 측정한 4가지의 시료는 정제되지 않은 상태이며, 대조군으로 사용한 단일 화합물인 L-ascorbic acid와 BHA를 비교한 것을 고려하였을 때, *n*-BuOH fraction에는 항산화 효과가 뛰어난 물질이 존재할 것으로 예상된다.



**Table 11. DPPH radical scavenging effect of solvent fractions from *Glehnia littoralis* (EDA(%))**

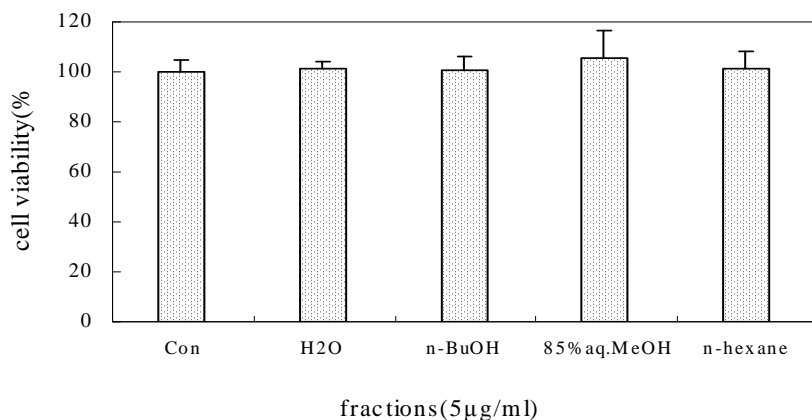
Sample	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )		
	100	50	25
<i>n</i> -hexane fr.	14.58	13.54	12.71
85% aq. MeOH fr.	22.19	14.17	13.02
<i>n</i> -BuOH fr.	46.67	29.48	21.88
H <sub>2</sub> O fr.	14.90	14.06	13.13
BHA	89.75	89.54	86.44
L-ascorbic acid	96.35	96.46	96.46

### 3-3. 세포수준에서의 항산화 활성

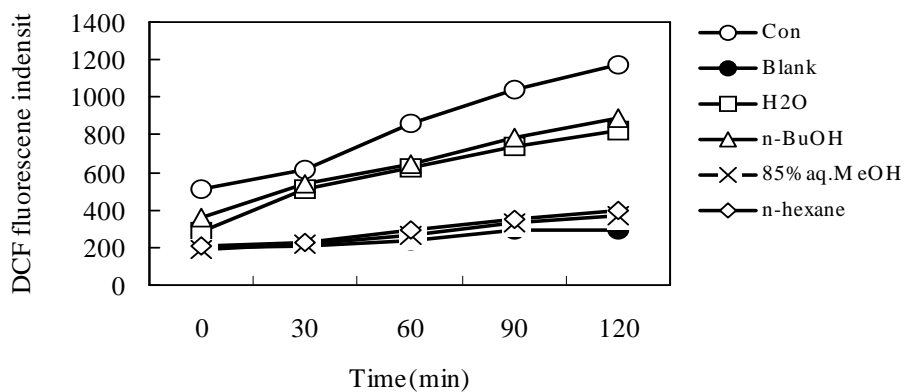
#### (1) 갯방풍 용매분획의 활성

##### 1) ROS (total free radical 측정) 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용하여 세포내 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였으며, 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리한 후 0분부터 30분 간격으로 120분 동안 측정하여 갯방풍의 활성을 검색하였다. ROS를 측정하기 전 4개의 용매 분획층들은 각각 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 조사하였고 그 중 세포의 증식에 영향을 미치지 않는 농도 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리 농도로 하였다 (Fig. 61). 대조군으로는 시료를 넣지 않고 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리한 control 과 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리한 control은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하였으며, 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리하지 않은 blank는 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 높게 증가하지 않았다. 조추출물을 용매 분획하여 얻어진 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH,  $\text{H}_2\text{O}$  fractions은 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  처리 후 2시간 동안 30분 간격으로 DCF fluorescence를 측정한 결과 85% aq.MeOH fraction과 *n*-hexane fraction이 control 및 blank와 비교하였을 때, 측정된 농도에서 높은 활성을 보였으며, 측정된 2시간 동안 계속적으로 높은 항산화 활성을 보였다.  $\text{H}_2\text{O}$ 와 *n*-BuOH fractions은 blank와 비교하였을 때는 높은 활성을 나타내지는 않았지만 control과 비교하였을 때 약간의 항산화 활성 나타내었으며 85% aq.MeOH fraction과 *n*-hexane fraction보다는 낮은 항산화 활성을 보였다 (Fig. 62).



**Fig. 63. Effect of solvent fractions from *Glehnia littoralis* on viability of HT1080 cells.**



**Fig. 64. Cellular radical scavenging effect of solvent fractions from *Glehnia littoralis* in HT1080 cells (5 µg/ml).**

## 2) 항암효과

### ① 암세포성장억제효과

염생식물인 갯방풍의 항암 생리활성 물질탐색을 위한 기초 연구로서 갯방풍의 4가지 용매별 분획물을 이용하여 HT1080 인체 섬유육종 세포 (HT1080 human fibrosarcoma cells), U937 인체 림프종세포 (U937 human histocytic lymphoma cells), AGS 인체 위암세포 (AGS human gastric carcinoma cells), HT-29 인체 결장암세포 (HT-29 colon adenocarcinoma cells)의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

HT1080 인체 섬유육종 세포에 갯방풍의 용매별 분획물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식 억제 정도를 보았다. 시료처리 농도 5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 85% aq. MeOH 분획층은 대조군에 비해 암세포 증식억제효과가 전혀 없었으나 10  $\mu\text{g/ml}$ 와 50  $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 각각 16%와 77%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. *n*-hexane 분획층에서는 5  $\mu\text{g/ml}$  및 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 시료처리 농도에서 대조군에 비해 암세포 증식 억제효과가 거의 나타나지 않았으나 50  $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 60%의 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었다 ( $p<0.05$ ). 그러나  $\text{H}_2\text{O}$  분획층과 *n*-BuOH 분획층은 처리 농도 증가에 따른 차이 없이 모든 농도에서 대조군에 비해 10% 이하의 낮은 저해율을 보여 다른 분획물에 비해 암세포 증식저해효과가 거의 없는 것으로 나타났다 (Fig. 63).

U937 인체 림프종세포의 경우 용매별 분획층을 위와 같은 농도로 처리하였을 때 85% aq. MeOH 분획층에서는 5, 10 및 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 시료처리 농도에서 대조군과 비교하여 각각 29%, 83% 및 93%의 높은 암세포 증식저해효과를

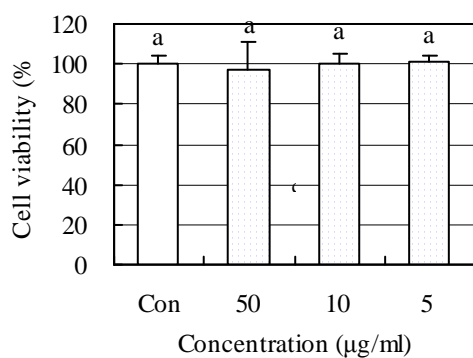
나타내었다. *n*-hexane층에서도 대조군과 비해 각각 44, 63, 93%의 암세포 성장 억제율을 보여 85% aq. MeOH 분획층과 유사하게 높은 저해효과가 있음을 확인할 수 있었다. H<sub>2</sub>O 분획층과 *n*-BuOH 분획층은 50 µg/ml의 농도에서도 35% 이하의 낮은 저해율로 농도의존적인 암세포 증식억제에는 거의 효과가 없었다 (Fig. 64).

이러한 갯방풍의 용매별 분획물의 인체 암세포에 대한 증식저해효과는 AGS 인체 위암세포 성장억제 실험에서도 관찰할 수 있었다. 각각의 분획층을 5, 10, 50 µg/ml의 처리농도로 첨가한 결과 85% aq. MeOH 분획층에서 대조군과 비교하여 각각 5, 70, 90%의 암세포 증식저해효과를 보였고 *n*-hexane층의 경우 5, 10 µg/ml의 농도에서는 낮은 저해효과를 보였으나 50 µg/ml 농도에서는 96%의 매우 높은 암세포 증식저해효과를 볼 수 있었다. H<sub>2</sub>O 분획층과 *n*-BuOH 분획층에서는 처리 농도의 증가에 따라 암세포의 증식이 감소하였으나 모든 처리 농도에서 대조군과 비교하여 낮은 저해율을 보여 다른 분획물에 비해 거의 효과가 없었다 (Fig. 65).

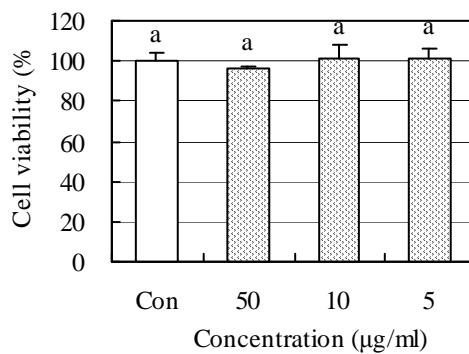
HT-29 인체 결장암세포에 갯방풍 용매별 분획물을 5, 10, 50 µg/ml의 농도로 처리한 결과를 Fig. 66에 나타내었다. 85% aq. MeOH 분획층은 5 µg/ml 처리농도에서는 대조군과 비교하여 암세포 증식저해효과가 전혀 없었으나 10 및 50 µg/ml 농도에서 각각 16 및 66%의 저해율로 용매 분획층 중 가장 높은 암세포 증식저해효과를 보였다. *n*-hexane 층에서는 5, 10 µg/ml 농도에서는 암세포 증식저해효과가 거의 나타나지 않았으나 50 µg/ml 농도에서 63%의 저해율로 85% aq. MeOH 분획층 다음으로 높은 효과를 보였다. 그러나 H<sub>2</sub>O

분획층과 *n*-BuOH 분획층은 HT1080 인체 암세포에서 나타난 결과와 유사하게 대조군에 비교하여 암세포 성장저해효과가 거의 나타나지 않았다.

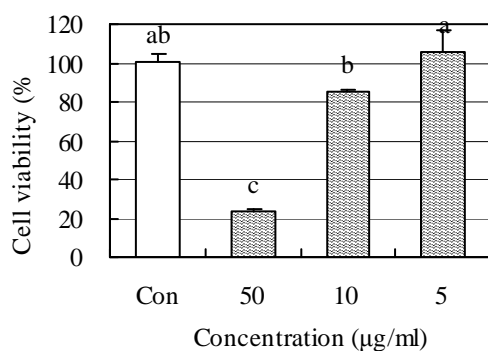
인체 암세포의 성장저해효과는 일부 분획층을 제외하고 각각의 처리 농도에 따라 차이가 있었으나 매우 유사한 경향을 나타내었다. HT1080 인체 섬유육종세포와 HT-29 인체 결장암세포의 경우 85% aq. MeOH, *n*-hexane 층에서 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서 약 60%이상의 높은 증식저해효과를 관찰할 수 있었다. 또한 AGS 인체 위암세포와 U937 인체 림프종세포의 성장저해효과는 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리농도에서 약 90% 이상의 월등히 높은 증식저해효과를 보였다.



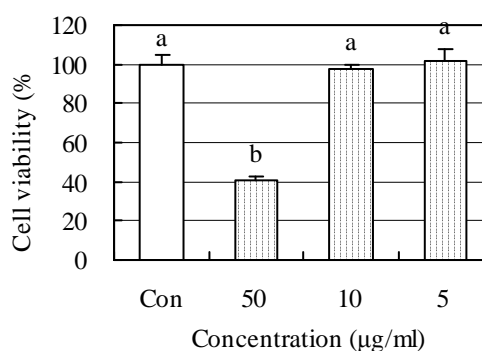
(a) H<sub>2</sub>O fr.



(b) *n*-BuOH fr.

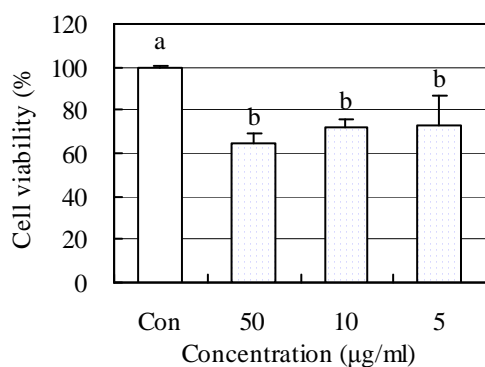


(c) 85% aq. MeOH fr.

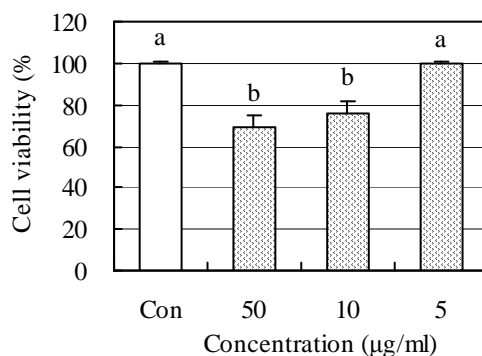


(d) *n*-hexane fr.

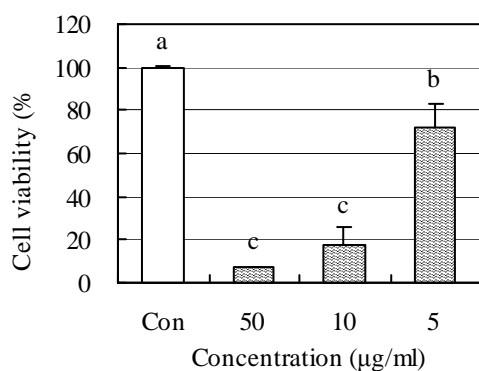
**Fig. 65. Effect of solvent fractions from *Glehnia littoralis* on viability of HT1080 cells.**



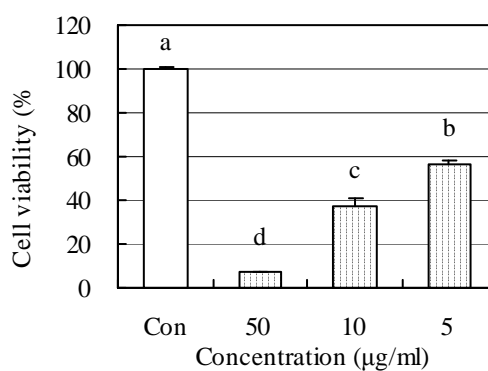
(a) H<sub>2</sub>O fr.



(b) *n*-BuOH fr.



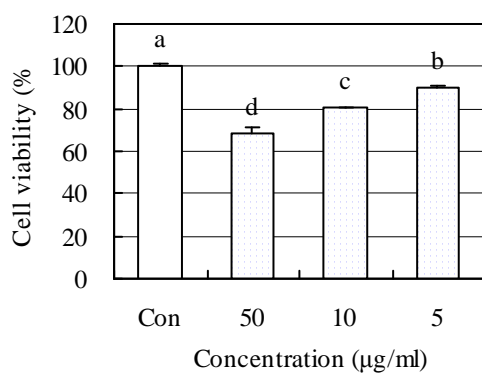
(c) 85% aq. MeOH fr.



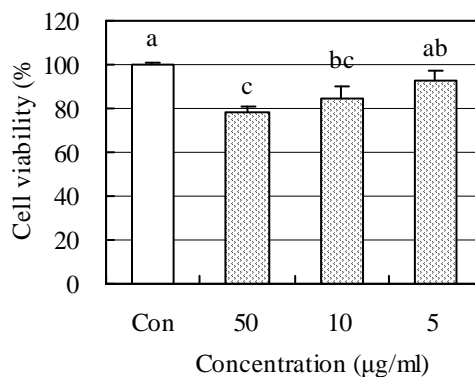
(d) *n*-hexane fr.

**Fig. 66. Effect of solvent fractions from *Glehnia littoralis* on viability of U937 cells.**

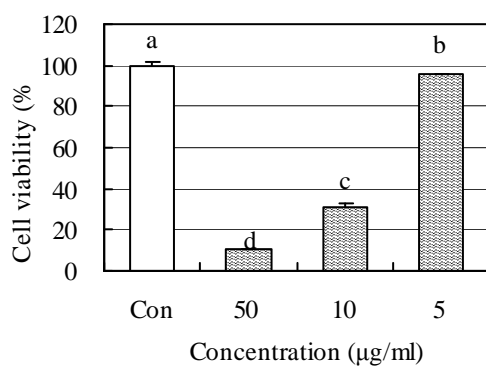




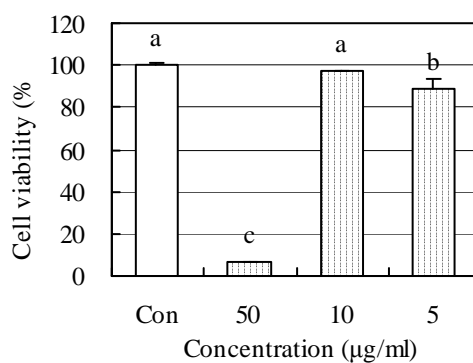
(a) H<sub>2</sub>O fr.



(b) *n*-BuOH fr.

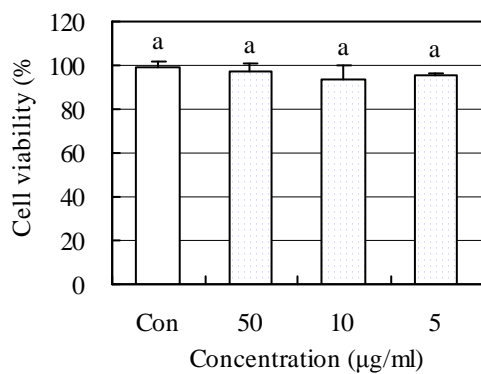


(c) 85% aq. MeOH fr.

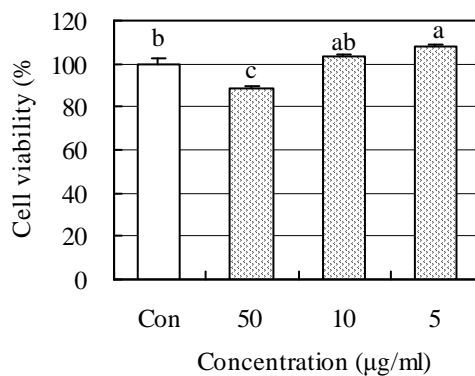


(d) *n*-hexane fr.

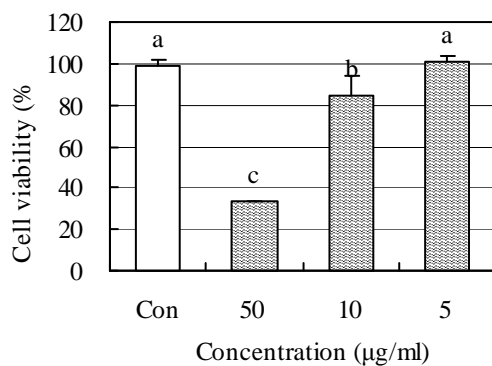
**Fig. 67.** Effect of solvent fractions from *Glehnia littoralis* on viability of AGS cells.



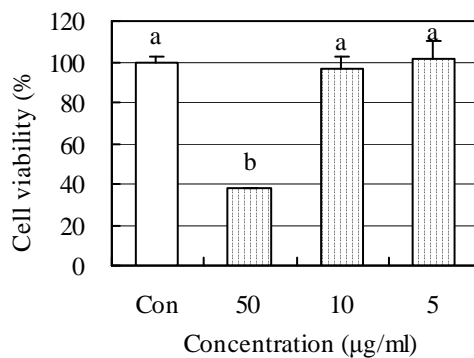
(a) H<sub>2</sub>O fr.



(b) *n*-BuOH fr.



(c) 85% aq. MeOH fr.

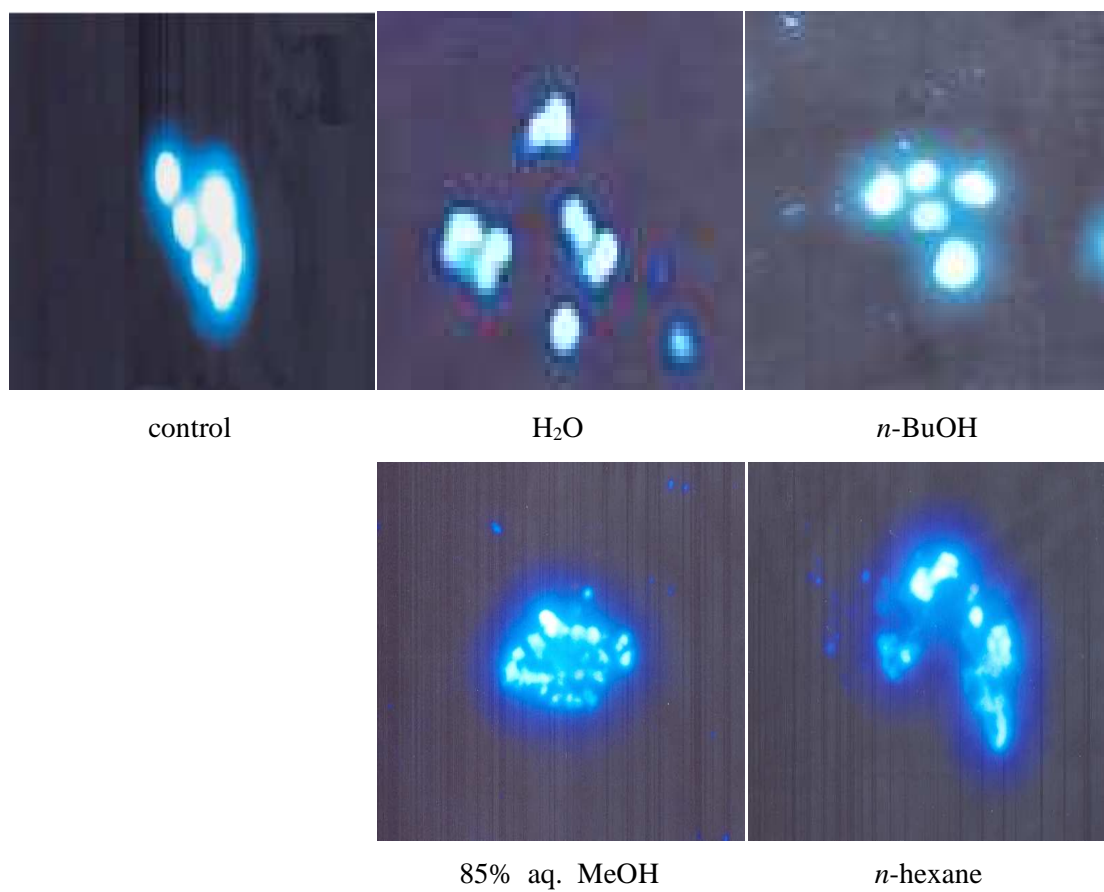


(d) *n*-hexane fr.

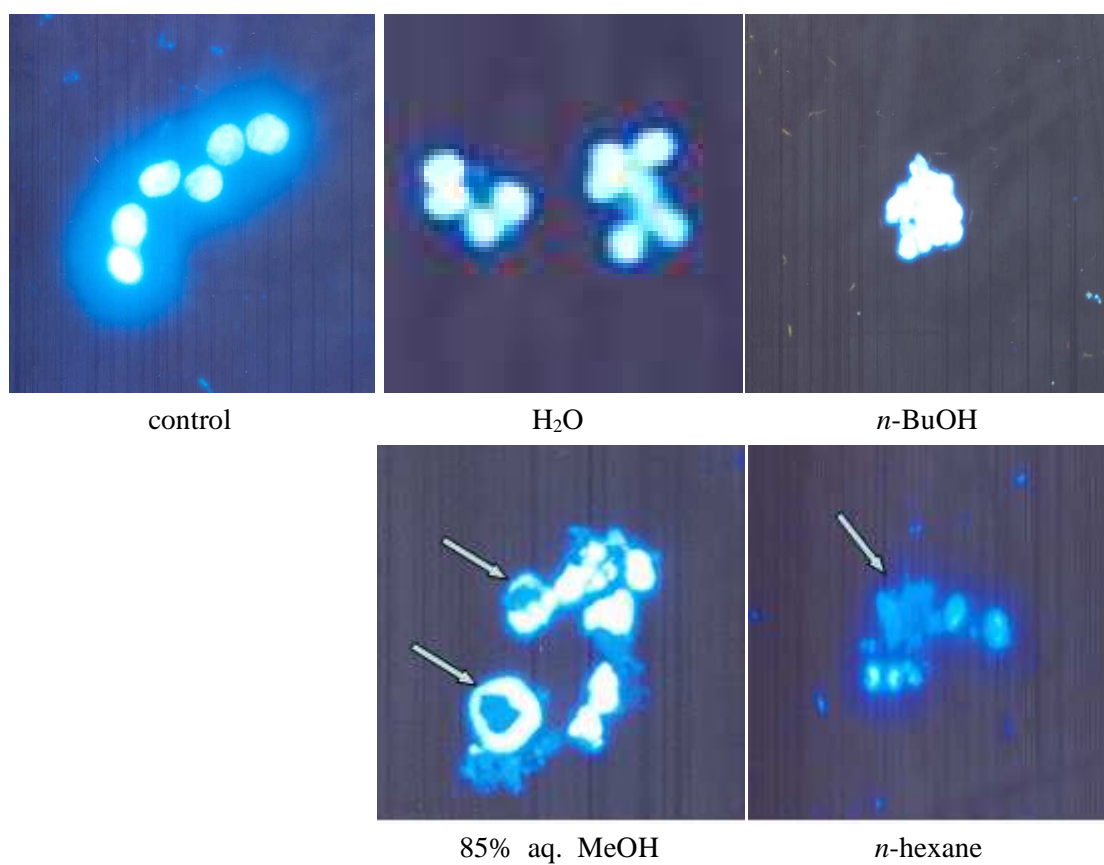
**Fig. 68.** Effect of solvent fractions from *Glehnia littoralis* on viability of HT-29 cells.

## ② DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

갯방풍 용매 분획층의 처리에 의한 암세포증식억제는 apoptosis유발에 의한 것으로 추측할 수 있으므로 용매분획층에 의한 apoptosis유발 가능성을 관찰하였다 (Fig. 69, 70). 이를 위하여 DAPI staining을 통한 암세포 핵의 형태적 특징을 관찰한 결과, 정상 배지에서 자란 ASG 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포는 모두 정상적인 핵의 형태를 띠고 있으나, 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane fractions이 함유된 배지에서 자란 세포의 핵은 apoptosis가 유발되었을 경우 나타나는 apoptotic body의 출현을 관찰할 수 있었다. 따라서 갯방풍은 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane fraction에서 apoptosis유발에 의한 암세포 성장 억제 효과를 나타내었으며, 이들 분획층에서의 항암물질이 존재할 것으로 추측된다.



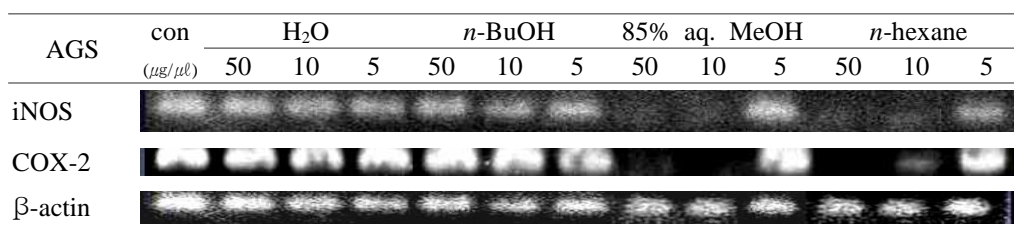
**Fig. 69. Induction of apoptosis by solvent fractions in AGS human gastric adenocarcinoma cells.**



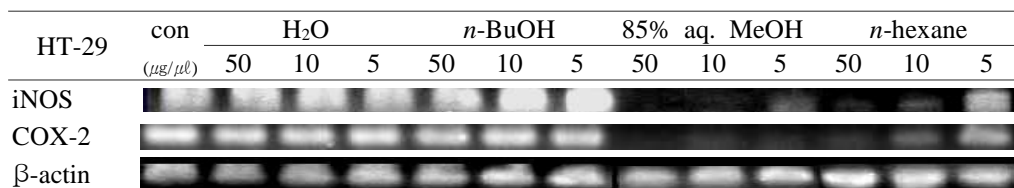
**Fig. 70.** Induction of apoptosis by solvent fractions in HT-29 human colon adenocarcinoma cells.

### ③ mRNA 발현에 미치는 효과

암세포 성장 억제 효과에서 월등히 높은 효과를 보인 AGS와 HT-29세포에 대해서 mRNA 발현에 미치는 효과를 측정하였다 (Fig. 69, 70). 염증 유전자로 알려진 iNOS 및 COX-2 유전자는 암세포의 증식 및 종양세포의 전이, 혈관신생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 갯방풍의 H<sub>2</sub>O와 *n*-BuOH fractions에서는 처리 농도에 따른 유전자 발현 억제 효과가 control에 비해 거의 나타나지 않은 반면, 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane fractions에서는 iNOS, COX-2 유전자의 발현이 처리 농도에 의존적으로 억제되었다. 이는 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane fractions에는 iNOS 및 COX-2에 대해 억제효과를 갖는 성분이 들어 있어 암세포의 증식에 필요한 혈관신생을 억제하거나 암세포의 자살을 유도한 것으로 사료된다.



**Fig. 71. Inhibition of COX-2 and iNOS by solvent fractions treatment in AGS human gastric carcinoma cells.**



**Fig. 72. Inhibition of COX-2 and iNOS by solvent fractions treatment in HT-29 human colon adenocarcinoma cells.**

## (2) 갯방풍에서 분리한 compound 1-9의 활성

### 1) ROS (total free radical 측정) 소거 활성

갯방풍의 분획물층으로부터 분리한 compound 1-9를 10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 DCFH-DA assay를 측정하였다. 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 120분 동안 처리한 후 DCF fluorescence를 측정하였으며, 대조군으로는 시료를 넣지 않고 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리한 control 과 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 측정결과 모든 화합물에서 ROS 소거활성을 나타내었으며 compound 4가 가장 높은 소거활성을 보였다(Fig. 73). 갯방풍으로부터 분리한 화합물은 모두 항산화 활성 효과가 있는 물질임을 확인하였다.

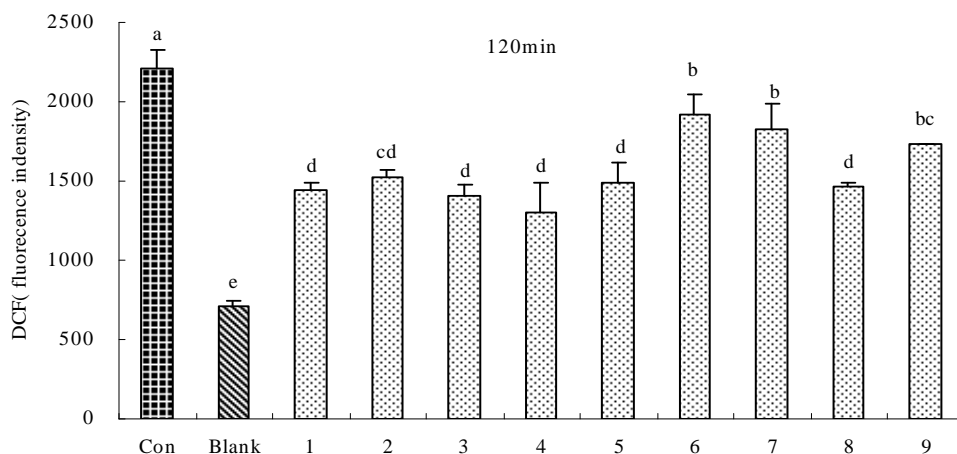


Fig. 73. Protective effect of compound 1-9 from *Glehnia littoralis* on oxidative stress (10  $\mu\text{M}$ ).

## 2) 항암효과

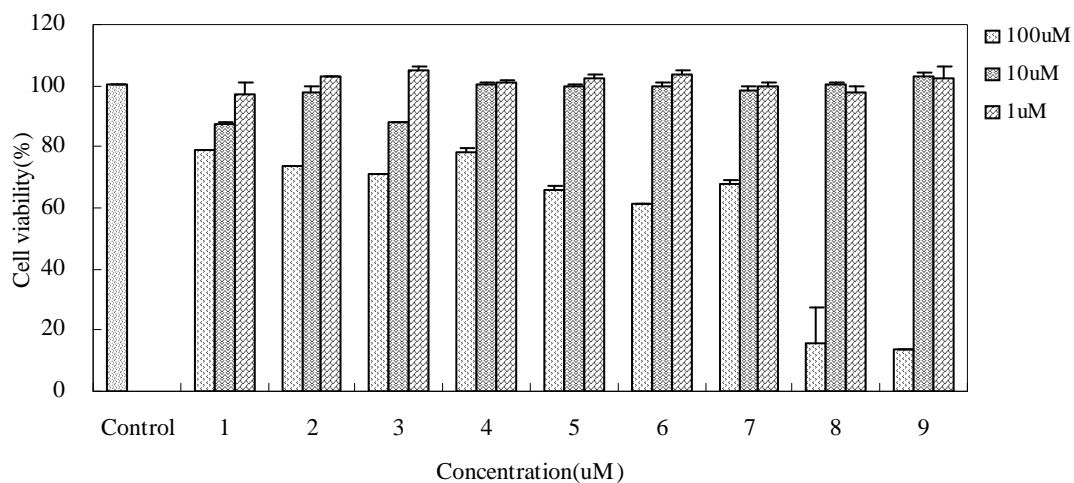
### ① 암세포성장억제효과

갯방풍으로부터 분리된 compound 1-9를 이용하여 HT1080 인체 섬유육종 세포 (HT1080 human fibrosarcoma cells), U937 인체 림프종세포 (U937 human histocytic lymphoma cells), AGS 인체 위암세포 (AGS human gastric carcinoma cells), HT-29 인체 결장암세포 (HT-29 colon adenocarcinoma cells)의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

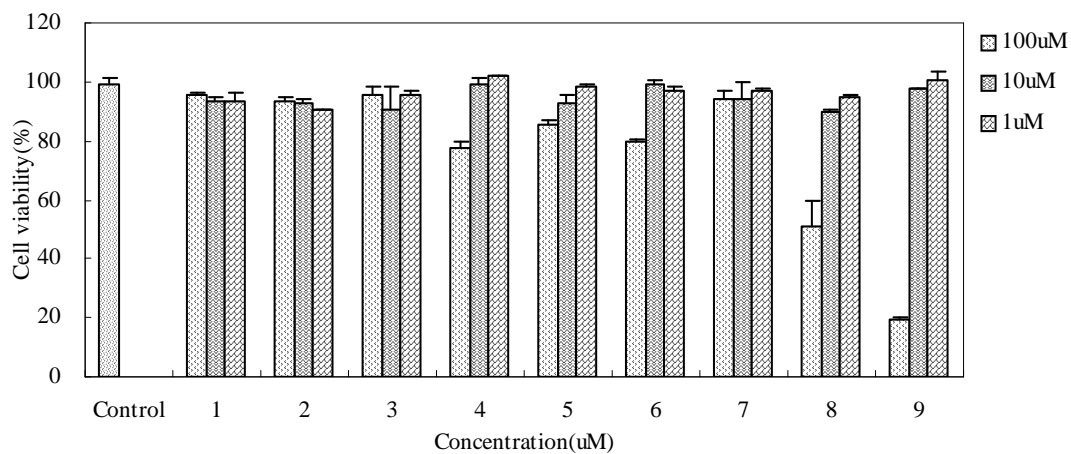
HT1080 인체 섬유육종 세포에 갯방풍의 compound 1-9를 농도별로 첨가하여 암세포 증식 억제 정도를 보았다. 시료처리 농도 100  $\mu$ M의 농도에서 compound 1-9 모두 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며 특히 compound 8과 9가 각각 84%와 86%의 뛰어난 암세포 증식 억제효과를 보였다 (Fig. 74).

HT1080 cells 뿐만 아니라 U937, AGS, HT-29 세포에서도 마찬가지로 compound 1-9를 농도별로 첨가하여 암세포 증식 억제 정도를 보았다. 시료처리 농도 100  $\mu$ M의 농도에서 compound 1-9 모두 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며 compound 8과 9가 4가지 암세포 모두에서 뛰어난 항암효과를 나타내었다 (Fig. 75, 76, 77).

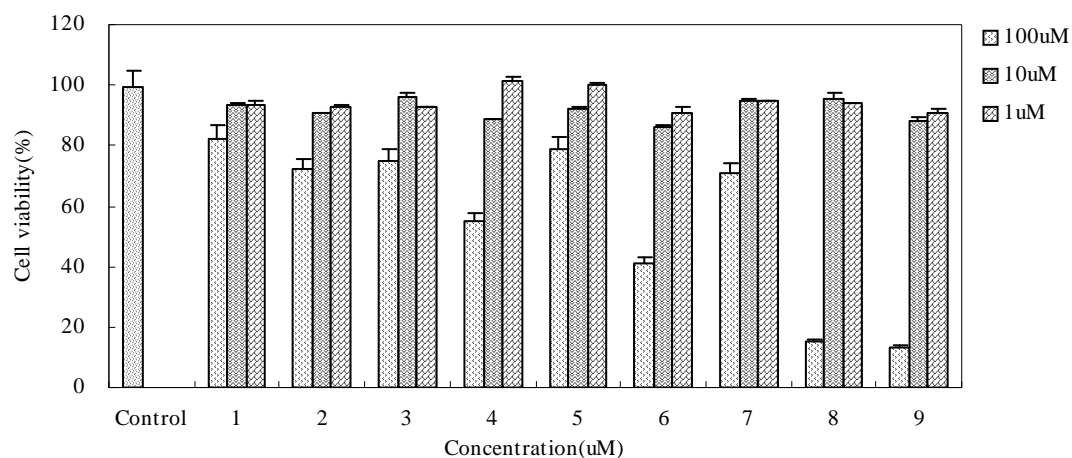




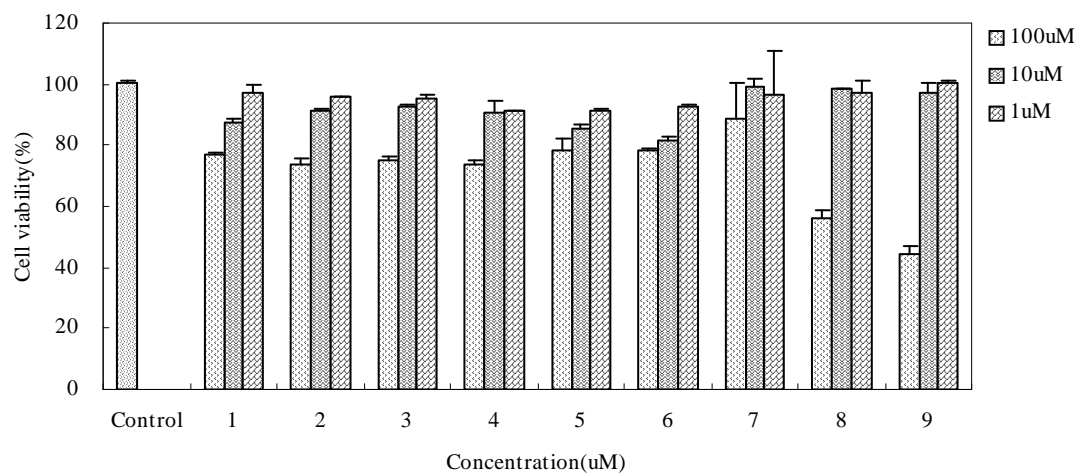
**Fig. 74.** Effect of compound 1-9 from *Glehnia littoralis* on viability of HT1080 cells.



**Fig. 75.** Effect of compound 1-9 from *Glehnia littoralis* on viability of U937 cells.



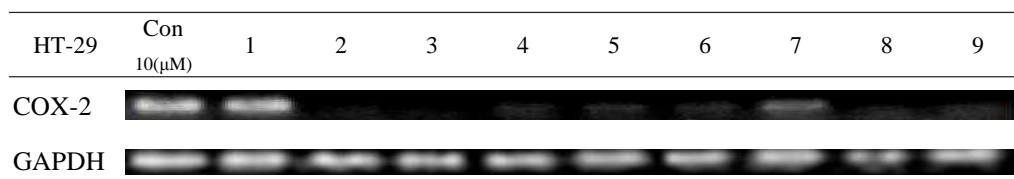
**Fig. 76.** Effect of compound 1-9 from *Glehnia littoralis* on viability of AGS human cancer cells.



**Fig. 77.** Effect of compound 1-9 from *Glehnia littoralis* on viability of HT-29 human cancer cells.

## ② mRNA 발현에 미치는 효과

갯방풍으로부터 분리된 compound 1-9를 이용하여 암세포 성장 억제 효과에서 월등히 높은 효과를 보인 HT-29 결장암세포에 대해서 COX-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 검토하였다 (Fig. 78). COX는 COX-1과 COX-2의 2개의 isoform 형태로 존재하는데 COX-1의 경우 대부분의 조직에서 외부의 자극에 상관없이 지속적으로 발현되는 반면 COX-2의 경우는 정상적으로는 발현되지 않지만 성장인자, 발암물질 등의 여러 세포 외적인 자극에 의해 합성될 수 있다. Compound 1-9를 각각 10  $\mu$ M씩 처리했을 때 모든 화합물이 HT-29 결장암세포에 대해 COX-2에 대한 억제효과를 갖는 것으로 관찰되었다. 이 결과로부터 화합물들이 COX-2의 발현을 감소시킴으로써 염증에 대한 반응을 감소시키는 역할을 하여 암세포의 증식능 및 세포 자멸사에 영향을 미치는 것으로 사료된다.



**Fig. 78. Inhibition of COX-2 by compounds treatment in HT-29 human colon adenocarcinoma cells.**

#### 4. 요약 및 결론

염생식물은 육상식물과는 다르게 염분이 높은 지역에서 자라기 때문에 생육을 위한 독특한 생리활성물질을 가질 가능성이 높은 식물임에도 불구하고 이에 대한 천연물 화학적 연구는 아직까지 많이 이루어지지 않았다. 이러한 염생식물 자원들 중에 우리나라 연안에 많이 분포할 뿐만 아니라 식용으로 재배되고 있으며 이전부터 민간에서 약용식물로 이용되고 있는 갯방풍 (*Glehnia littoralis*)을 채집하여 이 식물의 2차 대사산물을 분리하고 그 구조를 결정한 후에 여러 생리활성검색을 통하여 이들 식물의 산업적 활용 가능성에 대한 탐색연구를 시도하였다. 갯방풍은 우리나라의 연안에 많이 분포함에도 불구하고 이 식물의 화학적 구성성분에 대한 연구는 거의 이루어 지지 않았다.

먼저 포항 연안에서 채집한 갯방풍을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 와 MeOH 용매로 각각 추출하여 두개의 조추출물을 얻었으며, 이를 합한 후에 용매의 극성에 따라 4개의 용매 분획인 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고  $\text{H}_2\text{O}$  fractions를 각각 얻었다. 이들에 대한 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과, *n*-BuOH fraction에서 가장 높은 소거 활성을 보였다.

$^1\text{H}$  NMR 데이터 분석과 항산화 활성결과를 바탕으로 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane fractions의 순서로 화학성분을 분리하기로 결정하였다. 먼저 *n*-BuOH fraction을  $\text{C}_{18}$  flash chromatography를 통해 7개의 subfraction으로 나누었으며, 그 중 50% aq. MeOH subfraction을 HP20와 sephadex LH20 column chromatography와 normal-phased HPLC(YMC-amino column)를 이용하여 3개의 화합물 1-3을 분리하였다. 85% aq. MeOH fraction 역시  $\text{C}_{18}$  flash chromatography를 통해 7개로 나누었으며 그 중 60% aq. MeOH, 80% aq. MeOH subfraction을 silica gel prep. TLC 및 reversed-phase HPLC를 통해 4개의 furocoumarin 계열의

화합물 4-7을 분리하였다. *n*-Hexane fraction은 silica gel column chromatography, reversed-phased HPLC 및 silica gel prep. TLC를 순차적으로 이용하여 2개의 화합물 8과 9를 분리하였다.

세포수준의 항산화 활성과 항암활성효과 측정에서 용매 분획층에서는 85% aq. MeOH fraction과 *n*-hexane fraction이 모든 항암세포에 대해 높은 증식 억제 효과를 나타내었고 특히 AGS 인체 위암세포에 대한 억제효과가 가장 큰 것으로 확인되었다. 또한 이들 용매 분획층은 apoptosis과정에서 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane fractions이 AGS와 HT-29 인체 암세포에서 iNOS와 COX-2 유전자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제한다는 것이 관측되었다.

분리된 화합물 9개에 대하여 ROS 소거 활성을 측정한 결과 모든 화합물이 높은 활성을 보였다. 항암세포 증식억제효과측정에서도 모든 화합물이 항암효과가 높은 것으로 나타났다.

위 실험 결과, 본 연구에 사용된 갯방풍(*Glehnia littoralis*)은 세포내 존재하는 활성 산소 종을 직접적으로 제거하는 항산화제 기능뿐만 아니라, 활성산소제거로 인한 암세포의 DNA를 손상시킴으로써 높은 암세포 증식억제효과를 가지는 것으로 확인되었으며 분리된 화합물 9개 역시 높은 항산화 활성과 암세포 증식 억제효과를 가지는 것으로 확인되었다. 따라서 앞으로 갯방풍에 대한 새로운 암예방, 항산화 식품 및 의약품의 소재로서의 개발이 기대되어진다.

## 5. 참고문헌

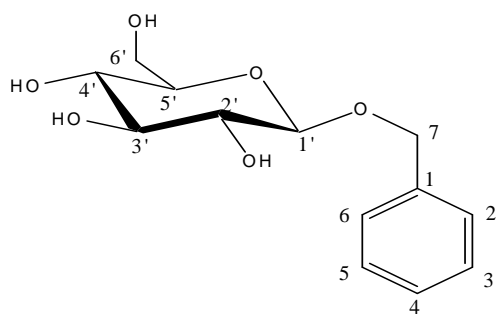
1. Chapman, Salt marshes and salt deserts of the world, Inerscience publishers, Inc., New York, 1960.
2. 임병선, 해안염생식물의 분포와 그 중요성, 2001.
3. 해양수산부, 2007.03.06.
4. Min B. M., Morphological adaptations by *Glehnia littoralis* to the biomass and heights of peripheral herbaceous plants in coastal sand dunes, Journal of plant Biology, 2006, 49(2), 123-132
5. Rozema J., Bijwaard, P., Prast, G. & Broekman, R. Ecophysiological adaptation of coastal halophytes from foredunes and salt marshes, *Vegetatio*, 1985, 62, 499-521. 1985.
6. Masuda T., Takasugi M., Anetai M., Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*, *Phytochemistry*, 1998, **47**, 13.
7. Chiang Su New Medicinal College (de.), "Dictionary of Chinese Crude Drug," Shanghai Scientific Technologic Publisher, Shanghai, 1977, p.644.
8. 최진규, 약초 이야기, 1997.
9. Hiraoka, N., Chang J. I., Bohm L. R., Bohm B. A., Furocoumarin and polyacetylenic compound composition of wild *Glehnia littoralis* in North America, *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, (2002), 321-325.
10. Ishikawa T., Segal Y., Kitajima J., Water-soluble constituents of *Glehnia littoralis* *Chem. Pharm. Bull.*, 49, 584-588(2001).
11. Matsuura H, Saxena G, Farmer S W, et al. Antibacterial and antifungal polyene compounds from *Glehnia littoralis* ssp. *leiocarpa* [J]. *Planta Med*, 1996, 62:

256-259.

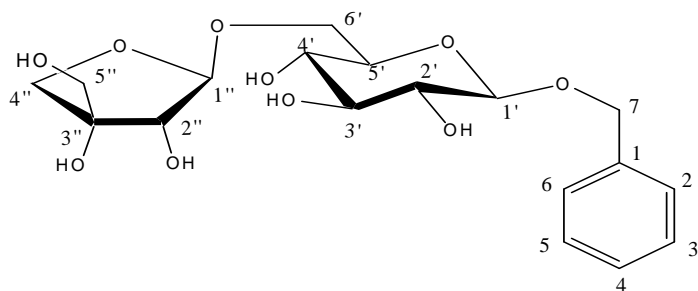
12. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 25, 1199-1200.
13. Okimotoa Y., Watanabea A., Nikia E, Yamashitab T., Noguchia N. (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* 474, 137-14.
14. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrohodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species, *Nitric Oxide* 1:145-157, 1997.
15. Mattihias Coen, Ralf engel, Adolf Nahrstedt, Chavicol  $\beta$ -D-Glucoside, aphenylpropanoid heteroside, benzyl- $\beta$ -D-Glucoside and glycosidically bound volatiles from subspecies of *Cedronella canariensis*, *Phytochemistry*, 1995, 40, 1, 149-155.
16. Rosa S. D., Giulio A. D., Tommonaro G., Aliphatic and aromatic glycoside from the cell cultures of *Lycopersicon esculentum*, *Phytochemistry*, 1996, 42, 4, 1031-1034.
17. M. Ono, Y. Ito, T. Ishikawa, J. Kitajima, Y. Tanaka, Y. Niiho and T. Nohara., Five New Monoterpene Glycosides and Other Compounds from Foeniculi Fructus (Fruit of *Foeniculum vulgare* MILLER), *Chem. Pharm. Bull.*, 44(2), 337-342, 1996.
18. Gilles Comte, Daovy P. Allais, Albert J. Chulia, Joseph Vercauteren, Noel Pinaud, Three phenylpropanoids from *Juniperus phoenicea*, *Phytochemistry*. 1997, 44, 6, 1169-1173.
19. Elgmal, M, H. A., Elewa, N, H., Elkhisy, E.A.M. and Duddck, H.,  $^{13}\text{C}$  NMR

- chemical shift and carbon proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones, *Phytochemistry*, 1979, 18, 139.
20. Lee G., Park H. G., Choi M. L., Kim Y. H., Park Y. B., Song K. S., Cheong C. J., Bae Y. S., Falcarindiol , a Polyacetylenic Compound Isolated from *Peucedanum japonicum*, Inhibits Mammalian DNA Topoisomerase I, *J. Microbiol. Biotechnol*, 2000, 10(3), 394-398.
21. Lene Hansen and Per M. Boll, The polyacetylenic falcarinol as the major allergen in *Schefflera arboricola*, *Phytochemistry*, 1986, 25, 529-530.

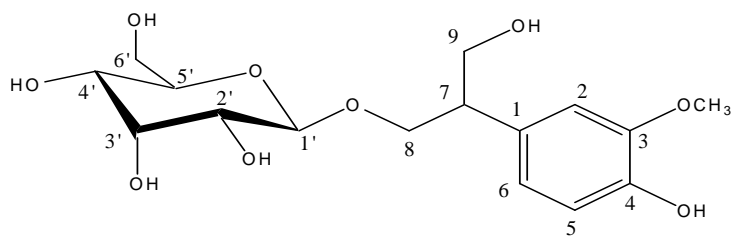




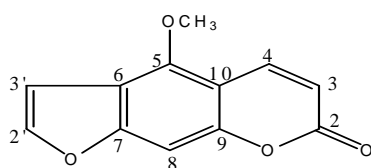
**Compound 1**



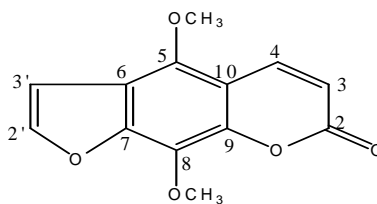
**Compound 2**



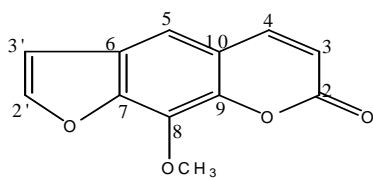
**Compound 3**



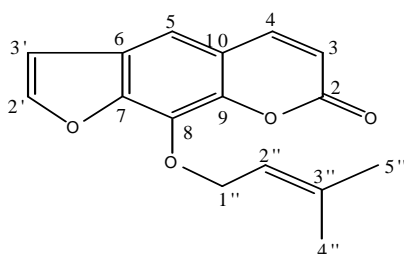
**Compound 4**



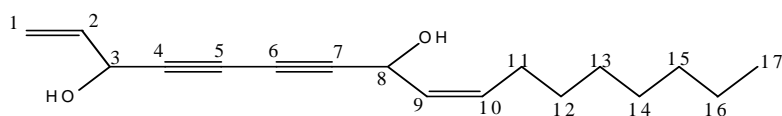
**Compound 5**



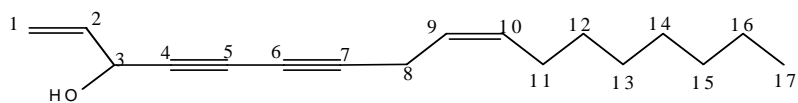
**Compound 6**



**Compound 7**



**Compound 8**



**Compound 9**